



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 54 622 A 1**

⑲ Aktenzeichen: 197 54 622.6
⑳ Anmeldetag: 9. 12. 97
㉑ Offenlegungstag: 10. 6. 99

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 N 9/10
C 12 N 15/54
C 07 H 21/04
C 12 N 15/63
C 07 K 16/40
C 12 N 1/00
C 12 N 15/82
A 01 H 5/00
A 01 H 1/00
C 12 N 5/10
C 07 K 14/415

DE 197 54 622 A 1

⑦① Anmelder:
Schaewen, Antje von, Dr., 49076 Osnabrück, DE

⑦④ Vertreter:
WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
WO 96 21 038
CA 119:245692f;
CA 120:294245s;
EMBL-Genbank AC B24856;
EMBL-Genbank AC AC000098;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Pflanzliche Gntl-Sequenzen und Verwendung derselben zur Gewinnung von Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI)-Aktivität

⑤⑦ Die Erfindung betrifft pflanzliche Gntl-Sequenzen, insbesondere pflanzliche Nukleinsäuresequenzen, die das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) kodieren, davon abgeleitete DNA-Sequenzen einschließlich Gntl-"antisense"- und "sense"-Konstrukten, und deren Translationsprodukte, gegen diese Translationsprodukte gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der Sequenzinformation zur Gewinnung von transformierten Mikroorganismen und von transgenen Pflanzen, einschließlich solchen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität. Derartige Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität sind zur Herstellung von Glykoproteinen spezifischer Konstitution bezüglich der Zuckerreste von großer Bedeutung.

DE 197 54 622 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft pflanzliche GntI-Sequenzen, insbesondere pflanzliche Nukleinsäuresequenzen, die das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) kodieren, wie auch davon abgeleitete GntI-"antisense"- bzw. "sense"-Konstrukte, und deren Translationsprodukte, gegen diese Translationsprodukte gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der Sequenzinformation zur Gewinnung von transformierten Mikroorganismen und von transgenen Pflanzen, einschließlich solchen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität. Derartige Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität sind zur Herstellung von Glykoproteinen spezifischer Konstitution bezüglich der Zuckerreste von großer Bedeutung.

10

Stand der Technik

In Eukaryonten werden Glykoproteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) cotranslational (d. h. bei Import in das ER-Lumen) durch Verknüpfung von zunächst membrangebundenen Glykanen (an Dolicholpyrophosphat) mit spezifischen Asparagin-Resten in der wachsenden Polypeptidkette zusammengesetzt (N-Glykosylierung). In höheren Organismen unterliegen Zuckereinheiten, die an der Oberfläche der gefalteten Polypeptidkette liegen, in den Golgi-Zisternen weiteren Trimm- und Modifikationsreaktionen (Ref. 1). Durch verschiedene Glykosidasen und Glykosyltransferasen im ER werden zunächst typische $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Grundeinheiten des "high"-Mannose-Typs gebildet und anschließend bei Passage durch die verschiedenen Golgi-Zisternen in sogenannte "komplexe" Glykane umgewandelt. Letztere zeichnen sich durch weniger Mannose-Einheiten und den Besitz weiterer Zuckerreste, wie Fucose, Galaktose und/oder Xylose in Pflanzen bzw. Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure, NeuNAc) in Säugern, aus (Ref. 1, 2, 3). Das Ausmaß der Modifikationen ist von Glykoprotein zu Glykoprotein verschieden. Einzelne Polypeptidketten können heterogene Zuckerketten tragen. Zudem kann das Glykosylierungsmuster für ein bestimmtes Polypeptid variieren (gewebespezifische Unterschiede), und muß auch nicht immer bezüglich einer bestimmten Glykosylierungsstelle gleich sein, was als "Mikroheterogenität" bezeichnet wird (Ref. 4, 5). Die Rolle von Asparagin-ständigen Glykanen ist bislang kaum verstanden, was u. a. daraus resultiert, daß diese mehrere Funktionen erfüllen können (Ref. 6). Jedoch ist anzunehmen, daß beispielsweise der Schutz einer Polypeptidkette vor proteolytischem Abbau auch durch Glykane eines einfacheren Oligomannosyl-Typs gewährleistet werden kann (Ref. 7).

30

Problemstellung

Glykoproteine sind für Medizin und Forschung von großer Bedeutung. Eine Isolierung von Glykoproteinen im Großmaßstab ist jedoch aufwendig und teuer. Die direkte Anwendung konventionell isolierter Glykoproteine ist oft problematisch, da einzelne Reste der Glykan-Komponenten bei Verabreichung als Therapeutikum ungewünschte Nebenwirkungen auslösen können. Dabei trägt die Glykan-Komponente vor allem zu den physikochemischen Eigenschaften (wie Faltung, Stabilität und Löslichkeit) der Glykoproteine bei. Des weiteren tragen isolierte Glykoproteine, wie bereits ausgeführt, selten einheitliche Zuckerreste, was als "Mikroheterogenität" bezeichnet wird.

Hefen erweisen sich zur Gewinnung von Glykoproteinen für Medizin und Forschung als ungeeignet, da sie nur Glykosylierungen zum sogenannten "high"-Mannose-Typ durchführen können. Insekten und höhere Pflanzen zeigen zwar "komplexe", aber von Tieren abweichende Glykoproteinmodifikationen. Aus Pflanzen isolierte Glykoproteine wirken deshalb in Säugern stark antigen. Tierische Organismen mit Glykosylierungsdefekten sind meist nicht lebensfähig, da die terminalen Glykan-Reste (beispielsweise membranständiger Glykoproteine) meist biologische Signalfunktion besitzen und vor allem für die Zell-Zellerkennung während der Embryonalentwicklung unentbehrlich sind. Es existieren zwar bereits Säugerzelllinien mit definierten Glykosylierungsdefekten, jedoch ist deren Kultivierung arbeitsintensiv und teuer.

Im Einzelnen wurden für Säuger auf Zellkulturebene bereits unterschiedliche Glykosylierungsmutanten beschrieben (Ref. 7, 8, 9, 10). Diese Mutanten sind entweder in der Biosynthese reifer Oligosaccharidketten am Dolicholpyrophosphat oder in der Glykan-Prozessierung betroffen bzw. zeigen Abweichungen in ihren terminalen Zuckerresten. Einige dieser Zelllinien weisen einen konditional-lethalen Phänotyp auf oder zeigen Defekte im intrazellulären Proteintransport. Die Folgen dieser Defekte für den intakten Organismus sind schwer abschätzbar. Es wurde beobachtet, daß eine Veränderung im Muster komplexer Glykane auf Zelloberflächen von Säugern mit Tumor- und Metastasenbildung einhergeht, obwohl eine funktionale Beziehung noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (Ref. 9). Glykosylierungsmutanten kommen in Säugern daher sehr selten vor. Diese unter HEMPAS (Hereditary Erythroblastic Multinuclearity with a Positive Acidified Serum lysis test) zusammengefaßten Defekte (Ref. 10, 11) beruhen entweder auf einem Defizit von Mannosidase II und/oder niedrigen Gehalten des Enzyms N-Acetylglucosaminyltransferase II (GnTII) und wirken sich stark einschränkend auf die Lebensfähigkeit des mutierten Organismus aus. GntI-"knock out"-Mäuse, in denen das Gen für GnTI zerstört wurde, sterben bereits "in utero" an multiplen Entwicklungsdefekten (mündliche Mitteilung, H. Schachter, Toronto).

Für Pflanzen waren bis vor kurzem keine vergleichbaren Mutanten bekannt. Durch den Einsatz eines Antiserums, das spezifisch "komplex"-modifizierte Glykanketten pflanzlicher Glykoproteine erkennt und hauptsächlich gegen die hochantigenen $\beta 1 \rightarrow 2$ verknüpften Xylose-Reste gerichtet ist (Ref. 12), konnte die Anmelderin aus einer EMS-mutagenisierten F2-Population der genetischen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* mehrere unabhängige Mutanten isolieren, die keine "komplexe" Glykoproteinmodifikation mehr zeigten (complex glycan, cgl-Mutanten). Nach mindestens fünf Rückkreuzungen, jeweils gefolgt von intermittierenden Selbstungen (zum Wiederauffinden des rezessiven Defekts), wurden die Glykoproteine analysiert. Diese trugen hauptsächlich Glykane des $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Typs, was auf einen Defekt in N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) hindeutete (Ref. 8). Tatsächlich fehlte den *Arabidopsis* cgl-Mutanten GnTI-Aktivität (Ref. 13), welche normalerweise die erste Reaktion im Syntheseweg zu "komplex" modifizierten Zuckerketten katalysiert (Ref. 1). Nach bisherigen Beobachtungen resultiert daraus allerdings keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der mutierten Pflanzen. In neueren Publikationen werden Pflanzen als mögliche Quelle zur Herstellung

von pharmazeutisch relevanten Glykoproteinen oder Vakzinen vorgeschlagen (Ref. 14, 15). Darin wird jedoch übersehen, daß aus Pflanzen isolierte Glykoproteine in Säugern starke Immunreaktionen auslösen können, was bisher einer Produktion heterologer Glykoproteine in Kulturpflanzen im Wege stand.

Pflanzen kommen weitgehend ohne "komplex" modifizierte Glykoproteine aus, wie die Anmelderin am Beispiel der *Arabidopsis cgl*-Mutante zeigen konnte (Ref. 13). In der Mutante werden sekretorische Proteine im ER zunächst normal glykosyliert. Im Golgi-Apparat der *Cgl*-Mutante bleiben die über Asparagin-Reste (N-Glykosylierung) an das Polypeptidrückgrat gebundenen Oligomannosylketten dann jedoch auf Stufe von $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Resten stehen, da N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) -Aktivität fehlt (Fig. 1). Durch diesen Biosyntheseblock wird die pflanzenspezifische "komplexe" Glykoproteinmodifikation und insbesondere die Anheftung von $\alpha 1 \rightarrow 3$ Fucose- und $\beta 1 \rightarrow 2$ Xylose-Resten verhindert, wodurch die stark antigene Wirkung auf den Säugerorganismus entfällt. Als krautige Pflanze besitzt *Arabidopsis* jedoch wenig verwertbare Biomasse. Zur Herstellung von biotechnologisch relevanten Glykoproteinen im Großmaßstab sind diese *cgl*-Pflanzen deshalb weniger geeignet. Als Alternative wären Kultursorten, insbesondere Solanaceen, wie z. B. Kartoffel, Tabak, Tomate oder Paprika, und des weiteren Luzerne, Raps, Rüben, Soja, Salat, Mais, Reis, und Getreide, mit fehlender oder stark gedrosselter GnTI-Aktivität ideal zur Produktion von heterologen Glykoproteinen in Pflanzen. Dazu würden sich Verfahren des "homology-dependent gene silencing" (Ref. 16, 17) anbieten.

Wie Fig. 3 zeigt, ist die Homologie der ersten ermittelten pflanzlichen GnTI-Sequenz aus Kartoffel (*Solanum tuberosum* L., St) im Vergleich mit den entsprechenden bekannten Sequenzen aus tierischen Organismen außerordentlich niedrig (nur 30–40% Identität auf Proteinebene, vgl. Fig. 3A), so daß eine effiziente Drosselung der endogenen "komplexen" Glykoproteinmodifikation in Pflanzen mittels "antisense" bzw. "sense"-Suppression (Ref. 21) durch die Verwendung bereits bekannter heterologer GnTI-Gen-sequenzen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht erreicht werden kann.

Für Medizin und Forschung besteht daher nach wie vor ein Bedarf, rekombinante Glykoproteine mit minimalen und einheitlichen, also definierten Zuckerresten in geeigneten Organismen kostengünstig herstellen zu können.

Wesen der Erfindung

Nachdem die Anmelderin erstmals pflanzliche GnTI-cDNA-Sequenzen isolieren und aufklären konnte, ist es nun u. a. möglich, beliebige Pflanzen mit gedrosselter oder fehlender GnTI-Aktivität zu gewinnen, insbesondere herzustellen, bzw. entsprechende Mutanten durch revers-genetische Ansätze nach Transposon-(Ref. 18) bzw. T-DNA-Insertion (Ref. 19) aufzuspüren, um in diesen dann Glykoproteine mit niedrigem Antigenpotential zu produzieren.

i) Enzyme

Die Erfindung umfaßt allgemein verschiedene N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzyme (EC 2.4.1.101) aus Pflanzen, z. B. aus Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.), Tabak (*Nicotiana tabacum* L.) und *Arabidopsis thaliana*. Insbesondere betrifft die Erfindung die Enzyme, die in Fig. 2 und 3B sowie in dem beigefügten Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen aufweisen oder enthalten.

Von der Erfindung umfaßt sind ferner von den Aminosäuresequenzen der genannten Enzyme durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion, -modifikation oder durch C- und/oder N-terminale Verkürzung und/oder Verlängerung abgeleitete Enzyme, die, sofern sie enzymatische Aktivität zeigen, eine dem Ausgangsenzym vergleichbare Spezifität, also N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität, sowie ggf. vergleichbare Aktivität aufweisen.

Unter einer vergleichbaren Aktivität wird im vorliegenden Zusammenhang eine Aktivität verstanden, die bis zu 100% über oder unter der Aktivität des Ausgangsenzyms liegt. Von der Erfindung sind dementsprechend auch abgeleitete Enzyme oder Proteine mit sehr geringer oder vollständig fehlender enzymatischer Aktivität, nachweisbar mittels eines oder mehrerer der nachfolgend angegebenen Tests, umfaßt. Zum Nachweis der Enzymaktivität dient ein Standard-Test, der mit Mikrosomen-Fractionen entweder radioaktiv, z. B. mit UDP-[6- ^3H]GlcNAc als Substrat (Ref. 13), oder nicht-radioaktiv (HPLC-Methode; Ref. 20) durchgeführt wird. Pflanzliche GnTI-Aktivität kann subzellulär in Golgi-Fractionen nachgewiesen werden (Ref. 21). Enzymanreicherungen aus Pflanzen sind aufgrund der geringen Ausbeuten jedoch nahezu unmöglich.

Gegebenenfalls alternativ kann ein erfindungsgemäßes abgeleitetes Enzym als ein Enzym definiert werden, für das eine das Enzym kodierende DNA-Sequenz ermittelt oder abgeleitet werden kann, die mit der das Ausgangsenzym kodierenden DNA-Sequenz bzw. der dazu komplementären Sequenz unter stringenten Bedingungen, wie sie nachfolgend definiert werden, hybridisiert.

Ein dergestalt abgeleitetes Enzym stellt beispielsweise eine Isoform dar, die die Aminosäuren 74 bis 446 der in Fig. 2 und SEQ ID NO: 1 und 2 angegebenen Aminosäuresequenz umfaßt. Dieser Isoform fehlt u. a. der durch die Aminosäuren 10 bis 29 gebildete Membrananker, so daß diese Enzym-Isoform möglicherweise auf Grund dessen im Cytosol der Pflanze lokalisiert ist.

Als Beispiele für C- und/oder N-terminal verlängerte Proteine können Fusionsproteine genannt werden, die neben einer erfindungsgemäßen Aminosäuresequenz ein weiteres Protein umfassen, das beispielsweise eine andersartige enzymatische Aktivität aufweist oder auf andere Weise, z. B. aufgrund von Fluoreszenz oder Phosphoreszenz oder aufgrund einer Reaktivität mit spezifischen Antikörpern oder durch Binden an entsprechende Affinitätsmatrices, leicht nachweisbar ist.

Die Erfindung umfaßt gleichfalls Fragmente der genannten Enzyme, die ggf. keine enzymatische Aktivität mehr aufweisen. Diese Fragmente zeigen in der Regel jedoch antigene Wirkung in einem damit immunisierten Wirt und können folglich als Antigen zur Erzeugung monoklonaler oder polyklonaler Antikörper durch Immunisierung eines Wirtes mit diesen eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft darüberhinaus auch N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzyme insbesondere aus anderen Varietäten und Pflanzenarten, die zugänglich sind aufgrund der Hybridisierung ihrer Gene oder eines oder mehrerer Abschnitte ihrer Gene

- mit einer oder mehreren der nachfolgend erläuterten erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und/oder DNA-Fragmente und/oder
- mit geeigneten erfindungsgemäßen Hybridisierungssonden, die ausgehend von den im Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hergestellt werden können.

Von der Erfindung umfaßt sind ferner nach den vorstehend erläuterten Maßgaben von diesen N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzymen abgeleitete Enzyme oder Proteine, einschließlich Fusionsproteinen von diesen, sowie Fragmente aller dieser Enzyme oder Proteine.

ii) Antikörper

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung der vorstehend genannten Aminosäuresequenzen bzw. von antigen wirksamen Fragmenten davon zur Erzeugung von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern oder -seren durch Immunisierung von Wirten mit diesen Aminosäuresequenzen bzw. Fragmenten sowie Antikörper bzw. -seren an sich, die die vorstehend erläuterten Enzyme und/oder Antigene spezifisch erkennen und binden. Die allgemeine Vorgehensweise und die entsprechenden Techniken zur Erzeugung polyklonaler und monoklonaler Antikörper sind dem Fachmann gleichfalls wohlbekannt.

Beispielhaft wurde rekombinantes GnTI-Protein aus *Solanum tuberosum* mit 10 N-terminalen Histidin-Resten ("His-tag") durch Verwendung eines Fragments der in Fig. 2 und SEQ ID NO: 1 dargestellten GntI-cDNA (Nukleotide 275 bis 1395) in *E. coli* überexprimiert und nach Affinitätsreinigung über eine Metall-Chelat-Matrix als Antigen zur Erzeugung von polyklonalen Antiseren in Kaninchen eingesetzt (vgl. Beispiele 5 und 6).

Eine Anwendungsmöglichkeit der erfindungsgemäßen Antikörper besteht für das "Screenen" von Pflanzen auf das Vorhandensein von N-Acetylglucosaminyltransferase I.

Eine Bindung des erfindungsgemäßen Antikörpers an pflanzliche(s) Protein(e) zeigt das Vorliegen eines mit diesem Antikörper nachweisbaren N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzyms an. In einem späteren Schritt kann dieser Antikörper darüberhinaus, in der Regel dann kovalent an einen Träger gebunden, gegebenenfalls auch zur Anreicherung oder Reinigung des Enzyms mittels Säulenchromatographie eingesetzt werden.

Ein negatives Bindungsergebnis mit dem erfindungsgemäßen Antikörper, d. h. fehlende Bindung an die pflanzlichen Proteine, läßt wiederum auf ein fehlendes (oder durch Mutation stark verändertes) N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzym und damit auf fehlende oder stark verminderte N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität in einer untersuchten Pflanze schließen.

Techniken zum Ausführen der vorstehend angesprochenen "Screening"-Tests oder zur Enzymanreicherung bzw. -reinigung unter Einsatz von Antikörpersäulen oder anderen Affinitätsmatrices (vgl. Beispiele 5 und 6) sind dem Fachmann wohlbekannt.

iii) DNA-Sequenzen

Die Erfindung umfaßt ferner DNA-Sequenzen, die die erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen, einschließlich davon gemäß den vorstehenden Maßgaben abgeleitete Aminosäuresequenzen kodieren. Insbesondere betrifft die Erfindung das den in den Fig. 2 und 3B und im Sequenzprotokoll aufgeführten Aminosäuresequenzen jeweils zugrundeliegende Gen, und ganz besonders die in Fig. 2 und im Sequenzprotokoll aufgeführten cDNA-Sequenzen, sowie von diesen Genen und DNA-Sequenzen abgeleitete DNA-Sequenzen.

Unter abgeleiteten DNA-Sequenzen werden Sequenzen verstanden, die durch Substitution, Deletion und/oder Insertion von einzelnen oder mehreren und/oder kleineren Gruppen von Nukleotiden der vorstehend angegebenen Sequenzen und/oder durch Verkürzung oder Verlängerung am 5'- und/oder 3'-Ende erhalten werden. Die Modifizierungen innerhalb der DNA-Sequenz können zu abgeleiteten DNA-Sequenzen führen, die identische Aminosäuresequenzen verglichen mit der von der Ausgangs-DNA-Sequenz kodierten Aminosäuresequenz kodieren, oder aber auch zu solchen, bei denen einzelne oder einige wenige Aminosäuren gegenüber der Aminosäuresequenz, die die Ausgangs-DNA-Sequenz kodiert, verändert, d. h. substituiert, deletiert und/oder insertiert sind, oder auch solchen, die – ggf. zusätzlich – C- und/oder N-terminal verkürzt und/oder verlängert sind.

Die Erfindung erstreckt sich gleichfalls auf die zu den erfindungsgemäßen Genen und DNA-Sequenzen komplementären Sequenzen sowie auf deren RNA-Transkriptionsprodukte.

Von der Erfindung umfaßt sind insbesondere sämtliche, nach den vorstehend angegebenen Maßgaben abgeleiteten Sequenzen, die über ihre gesamte Länge hinweg oder lediglich mit einem oder mehreren Teilabschnitten unter stringenten Bedingungen mit den oben erläuterten Ausgangssequenzen oder den dazu komplementären Sequenzen oder Teilen davon hybridisieren, wie auch DNA-Sequenzen, die derartige Sequenzen umfassen.

Als Hybridisierung unter stringenten Bedingungen im Sinne der Erfindung wird eine Hybridisierung bei Vorgehensweise gemäß einem oder mehreren der nachstehend angegebenen Verfahren verstanden. Hybridisieren: Bis zu 20 Std. in PEG-Puffer nach Church und Gilbert (0,25 M Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 1% (w/v) BSA, 7% (w/v) SDS, pH 7,5 mit Phosphorsäure; Ref. 22) bei 42°C oder in Standard-Hybridisierungspuffern mit Formamid bei 42°C oder ohne Formamid bei 68°C (Ref. 23). Waschen: 3-mal 30 min bei 65°C in 3-fach SSC-Puffer (Ref. 23), 0,1% SDS.

Im Rahmen der vorliegenden Anmeldung ist der Begriff "Hybridisierung" stets als Hybridisierung unter stringenten Bedingungen, wie vorstehend angegeben, zu verstehen, auch wenn dies im Einzelfall nicht explizit angegeben ist.

Darüberhinaus erstreckt sich die Erfindung auch auf Fragmente der vorstehend erläuterten DNA-Sequenzen, einschließlich der nach den vorstehenden Maßgaben abgeleiteten DNA-Sequenzen, auf von derartigen Fragmenten durch Nukleinsäuresubstitution, -insertion und/oder -deletion abgeleitete Fragmente sowie auf die entsprechenden Fragmente mit dazu komplementären Sequenzen. Derartige Fragmente sind u. a. als Sequenzierungs- oder PCR-Primer, "Scree-

ning"-Sonden und/oder für Verwendungen, wie sie nachfolgend erläutert werden, geeignet. Für eine Verwendung als "Screening"- oder Hybridisierungsprobe werden die erfindungsgemäßen DNA-Fragmente häufig radioaktiv markiert eingesetzt. Fragmente mit Sequenzen, die von den vorstehend definierten Ausgangssequenzen durch Substitution, Deletion und/oder Insertion von einem oder mehreren Nukleotiden abgeleitet sind, bzw. die dazu komplementären Sequenzen sind in dem Umfang von der Erfindung umfaßt, als sie unter den vorstehend angegebenen stringenten Bedingungen mit den Ausgangssequenzen bzw. den dazu komplementären Sequenzen hybridisieren. 5

Erfindungsgemäße DNA-Fragmente können beispielsweise auf der Grundlage der im Sequenzprotokoll und in Fig. 2 angegebenen DNA-Sequenzen ausgehend von pflanzlicher DNA mittels Restriktionsendonukleasen unter Nutzung geeigneter Restriktionsschnittstellen oder durch Einsatz von PCR mittels geeignet synthetisierter Primer erhalten oder alternativ auch chemisch synthetisiert werden. Derartige Techniken sind dem Fachmann wohl bekannt. 10

Die Erfindung betrifft darüberhinaus auch jegliche DNA-Sequenzen, die ein Gen darstellen oder Teil eines Gens sind, das das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I kodiert, und die in ihrer Gesamtheit oder in einem Teilabschnitt

- mit einer der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und/oder
- mit einem oder mehreren der erfindungsgemäßen DNA-Fragmente und/oder
- mit einer DNA-Sequenz, die von den im Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes abgeleitet worden ist, unter stringenten Bedingungen hybridisieren. 15

Als DNA-Fragmente werden hierzu Hybridisierungs- oder "Screening"-Sonden eingesetzt, die üblicherweise mindestens 15 Nukleotide, typischerweise zwischen 15 und 30 Nukleotide, gegebenenfalls aber auch wesentlich mehr, umfassen. Es können dafür beispielsweise die in Beispiel 1 eingesetzten Primer Verwendung finden. Alternativ können DNA-Sequenzen geeigneter Länge, abgeleitet von den im Sequenzprotokoll angegebenen DNA-Sequenzen, eingesetzt werden. Als dritte Möglichkeit können geeignete erfindungsgemäße Hybridisierungssonden ausgehend von den im Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes entwickelt werden. 20 25

In diesem Sinne sind Gegenstand der Erfindung auch N-Acetylglucosaminyltransferase I kodierende Gene, die insbesondere aus anderen Varietäten oder Pflanzenarten aufgrund ihrer Hybridisierung mit den vorstehend angegebenen Hybridisierungssonden aufgefunden werden können, sowie davon gemäß den vorstehend erläuterten Maßgaben abgeleitete DNA-Sequenzen, DNA-Fragmente und -Konstrukte. 30

Die Isolierung des jeweiligen Gens und die Sequenzierung desselben nach der Auffindung mittels der erfindungsgemäßen Hybridisierungssonden liegen im Bereich der Fähigkeiten eines Fachmanns auf diesem Gebiet und sind exemplarisch in den Beispielen für N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Solanum tuberosum* und die entsprechenden Enzyme aus *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* (Teilsequenz) erläutert.

Gegenstand der Erfindung sind schließlich auch "antisense"-Sequenzen bezüglich jeglichen vorstehend erläuterten DNA-Sequenzen. 35

iv) Konstrukte

Von der Erfindung werden auch Konstrukte umfaßt, die ggf. neben zusätzlichen 5'- und/oder 3'-Sequenzen, z. B. Linkern und/oder regulatorischen DNA-Sequenzen, oder andersartigen Modifikationen die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, einschließlich der wie vorstehend ausgeführt abgeleiteten DNA-Sequenzen, umfassen. 40

Ein Beispiel hierfür sind Hybridisierungs- oder "Screening"-Sonden, die zusätzlich zu einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz noch ein in diesem Fall meist nichtradioaktives Nachweismittel für die Detektion von Hybridisierungsprodukten umfassen, z. B. fluoreszierende oder phosphoreszierende Moleküle, Biotin, Biotinderivate, Digoxigenin und Digoxigeninderivate. Es kommen in diesem Zusammenhang jedoch auch radioaktive oder nichtradioaktive Nachweismittel, die z. B. durch Endmarkierung an die erfindungsgemäße DNA-Sequenz angeheftet werden können, in Betracht. 45

Gegenstand der Erfindung sind auch "antisense"- und "sense"-Konstrukte bezüglich der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und -Fragmente, nämlich bezüglich

- der im Sequenzprotokoll angegebenen DNA-Sequenzen und der zugrundeliegenden Gene,
- der davon nach den vorstehenden Maßgaben abgeleiteten DNA-Sequenzen,
- eines oder mehrerer Abschnitte dieser DNA-Sequenzen,
- DNA-Sequenzen insbesondere aus anderen Varietäten oder Pflanzenarten, die ein Gen darstellen oder Teil eines Gens sind, welches das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I kodiert, und die
- mit einer der vorstehend genannten DNA-Sequenzen und/oder
- mit einem oder mehreren der vorstehend genannten DNA-Fragmente und/oder
- mit einer DNA-Sequenz, die von den im Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes abgeleitet worden ist, unter stringenten Bedingungen hybridisieren. 50 55 60

Des weiteren erstreckt sich die Erfindung auch auf jegliche DNA-Übertragungssysteme, wie Vektoren, Plasmide, Viren- und Phagen Genome oder Cosmide, die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, z. B. das GntI-Gen, erfindungsgemäße cDNA und DNA-Abschnitte, wie sie im Sequenzprotokoll angegeben sind, Fragmente davon, insbesondere "antisense"- oder "sense"-Konstrukte und/oder davon nach den vorstehenden Maßgaben abgeleitete DNA-Sequenzen, enthalten. 65

Diverse Techniken zur Gewinnung oder Synthese erfindungsgemäßer DNA, DNA-Fragmente, Konstrukte und Übertragungssysteme, z. B. ausgehend von pflanzlicher DNA durch Restriktion mittels Restriktionsendonukleasen, PCR-

Amplifizierung unter Einsatz geeigneter Primer, ggf. gefolgt von Klonierung und zusätzlicher chemischer oder enzymatischer Modifizierung, sind dem Fachmann wohl bekannt.

Eine Anwendungsmöglichkeit von erfindungsgemäßen DNA-Hybridisierungssonden liegt im Nachweis von N-Acetylglucosaminyltransferase I-Genen in anderen Pflanzen als jenen, aus denen die im Sequenzprotokoll angegebenen DNA-Sequenzen erhalten wurden, oder im Nachweis von möglichen (weiteren) Isoformen des N-Acetylglucosaminyltransferase I-Gens in den Ausgangspflanzen *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana*.

Kann für das Hybridisierungsexperiment auf eine genomische Bank oder cDNA-Bank einer Pflanze zurückgegriffen werden, liefert ein positives Hybridisierungsergebnis bei einem derartigen "Screening" oder Durchmustern der jeweiligen Bank den Hinweis auf einen Klon oder einige wenige Klone, die die gesuchte Sequenz, das N-Acetylglucosaminyltransferase I-Gen, vollständig oder teilweise in Verbindung mit nur einer begrenzten Menge weiterer DNA aus dem Genom der Zielpflanze enthalten, was die Klonierung und Sequenzierung des Zielgens entsprechend erleichtert. Alternativ kann ausgehend von pflanzlicher DNA und geeigneten Konstrukten, sogenannten PCR-Primern, auch eine PCR-Amplifikation des Gens oder von Teilen desselben vorgenommen werden, um Klonierung und Sequenzierung zu vereinfachen.

Ein Einsatz erfindungsgemäßer Sequenzierungsprimer, die ausgehend von geeigneten Abschnitten der erfindungsgemäßen Sequenzen synthetisiert werden, ermöglicht z. B. eine genomische Sequenzierung ausgehend von der vollständigen, durch Restriktionsendonukleasen geschnittenen genomischen DNA einer Zielpflanze mittels der Church-Gilbert-Technik wie auch z. B. eine Sequenzierung auf cDNA-Ebene nach RT-PCR-Amplifikation der Gesamt-RNA der Zielpflanze (vgl. Bsp. 1).

Eine alternative Anwendungsmöglichkeit von erfindungsgemäßen DNA-Hybridisierungssonden, die von den im Sequenzprotokoll angegebenen DNA-Sequenzen abgeleitet sind, besteht in der erfindungsgemäßen Verwendung derselben zum Nachweis von Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität. Das Hybridisierungsexperiment dient zur Detektion des Gens der N-Acetylglucosaminyltransferase I (*GnTI*) und erlaubt z. B. aufgrund eines negativen Hybridisierungsergebnisses unter stringenten Bedingungen den Rückschluß auf ein Fehlen des *GnTI*-Gens und damit fehlende N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität in einer untersuchten Pflanze.

Derartige Hybridisierungstechniken zum Nachweis von Proteinen oder Genen insbesondere in Pflanzenmaterial mittels DNA-Sonden sind dem Fachmann ebenfalls geläufig. Es wird in diesem Zusammenhang auf die vorstehenden Ausführungen zu möglichen Hybridisierungsbedingungen unter Punkt iii) verwiesen. Geeignete DNA-Hybridisierungssonden umfassen in der Regel mindestens 15 Nukleotide mit einer Sequenz, die z. B. von den in Fig. 2 und im Sequenzprotokoll angegebenen cDNA-Sequenzen oder den entsprechenden *GnTI*-Genen abgeleitet ist.

v) Transformierte Mikroorganismen

Die Erfindung erstreckt sich des weiteren auf Mikroorganismen, wie z. B. Bakterien, Bakteriophagen, Viren, einzellige eukaryotische Organismen, wie Pilze, Hefen, Protozoen, Algen und humane, tierische und pflanzliche Zellen, die durch eine oder mehrere der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder eines oder mehrere der erfindungsgemäßen Konstrukte, wie vorstehend erläutert, transformiert wurden.

Verwendung finden erfindungsgemäße transformierte Mikroorganismen beispielsweise als Expressionssysteme für die transformierende Fremd-DNA zur Gewinnung der entsprechenden Expressionsprodukte. Typische Mikroorganismen für diese Zwecke sind Bakterien, wie beispielsweise *E. coli*. Des weiteren können erfindungsgemäße transformierte Mikroorganismen, insbesondere Agrobakterien, z. B. zur Transformation von Pflanzen unter Weitergabe der transformierenden Fremd-DNA eingesetzt werden.

Verfahren zur Transformation von Mikroorganismenzellen durch (Fremd-)DNA sind dem Fachmann wohl bekannt. Hierfür werden z. B. als Expressionsvektoren bezeichnete Konstrukte eingesetzt, die die erfindungsgemäße DNA-Sequenz unter Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren, ggf. zusätzlich gewebespezifischen Promotors enthalten, um eine Expression der eingeschleusten DNA in der Ziel- oder Wirtszelle zu ermöglichen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist dementsprechend ein Verfahren zur Gewinnung der erfindungsgemäßen Enzyme und Proteine unter Einsatz eines oder mehrerer der erfindungsgemäßen transformierten Mikroorganismen. Das Verfahren umfaßt, mindestens einen durch erfindungsgemäße DNA, insbesondere eine der im Sequenzprotokoll angegebenen cDNAs, unter Kontrolle eines aktiven Promotors transformierten Mikroorganismus, wie vorstehend definiert, zu züchten und das erfindungsgemäße Enzym aus den Mikroorganismen und gegebenenfalls auch dem Kulturmedium zu isolieren. Das Verfahren erstreckt sich selbstverständlich auch auf die Gewinnung von den erfindungsgemäßen Enzymen aus *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* abgeleiteten Enzymen bzw. Proteinen, wie sie vorstehend unter i) definiert sind.

Verfahren zur Züchtung transformierter Mikroorganismen sind dem Fachmann wohl bekannt. Die Isolierung des exprimierten Enzyms kann beispielsweise gemäß dem in Beispiel 5 beschriebenen Verfahren mittels Metall-Chelat-Chromatographie oder alternativ durch Chromatographie an Säulen, die gegen das Enzym gerichtete Antikörper an das Packungsmaterial gebunden enthalten, erfolgen.

vi) Transgene Pflanzen

Die Erfindung umfaßt gleichfalls transgene Pflanzen, die mittels einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz bzw. eines entsprechenden Konstrukts transformiert worden sind. Es können so z. B. transgene Pflanzen erhalten werden, bei denen eine *GnTI*-Defizienz, z. B. aufgrund eines fehlenden oder schadhafte *GnTI*-Gens oder aufgrund von Defekten in den regulatorischen Bereichen dieses Gens, durch Komplementierung durch ein von den im Sequenzprotokoll angegebenen cDNA-Sequenzen abgeleitetes Konstrukt, dessen Expression unter Kontrolle eines aktiven konstitutiven oder induzierbaren, ggf. zusätzlich gewebespezifischen Promotors steht, beseitigt worden ist. Das aufgrund der in dem Konstrukt enthaltenen erfindungsgemäßen DNA exprimierte *GnTI*-Enzym oder Protein mit *GnTI*-Aktivität komplementiert in diesem Falle die in der Ausgangspflanze fehlende *GnTI*-Aktivität.

Gleichfalls in Betracht gezogen werden transgene Pflanzen, in denen die in der Ausgangspflanze bereits vorhandene GntI-Aktivität durch zusätzliche Expression des durch ein erfindungsgemäßes Konstrukt eingeschleusten GntI-Transgens erhöht ist. Ein bei der Untersuchung des Enzyms N-Acetylglucosaminyltransferase I in Pflanzen bestehendes Hauptproblem war bislang die überaus geringe Expression des GntI-Gens in vivo, verbunden mit einer überaus geringen Enzymaktivität, die entsprechend schwer nachzuweisen war. Durch Coexpression einer erfindungsgemäßen DNA kann das Problem zu geringer GntI-Enzymaktivität bei Pflanzen behoben werden.

In diesem Falle kann es bevorzugt sein, für die Transformation von Pflanzen erfindungsgemäße DNA einzusetzen, die zusätzlich einen Sequenzabschnitt umfaßt, der nach Expression eine vereinfachte Detektierung und/oder Anreicherung bzw. Reinigung des Proteinproduktes mit GntI-Aktivität ermöglicht. Beispielsweise gelingt dies durch Einsatz einer speziellen DNA-Sequenz für die Expression eines rekombinanten GntI-Enzyms, die eine N- oder C-terminale Sequenzverlängerung trägt, die einen Affinitätsmarker kodiert. Ist zusätzlich ein Aminosäuresequenzabschnitt zwischen GntI-Enzym und Affinitätsmarker vorgesehen, der eine Erkennungsstelle für eine spezifische Protease darstellt, kann durch nachträglichen Einsatz dieser spezifischen Protease die N- oder C-terminale Sequenzverlängerung von dem GntI-Enzym abgespalten und das GntI-Enzym dadurch isoliert erhalten werden.

Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz, die das rekombinante GntI-Enzym mit einer C-terminalen Sequenzverlängerung, die den Affinitätsmarker AWRHPQFGG ("Strep-tag"; Ref. 39) kodiert, und einer dazwischenliegenden Protease-Erkennungsstelle, IEGR, kodiert. Die Expression der erfindungsgemäßen DNA liefert GntI-Enzyme mit der angegebenen C-terminalen Sequenzverlängerung, über welche die exprimierten Proteinmoleküle spezifisch an eine Streptavidin-derivatisierte Matrix binden und so isoliert werden können. Mittels der die Aminosäuresequenz IEGR spezifisch erkennenden Protease Faktor Xa kann der GntI-Anteil der Proteinmoleküle dann freigesetzt werden. Alternativ kann das vollständige Protein von der Streptavidin-derivatisierten Matrix mittels Biotin oder Biotinderivaten abgelöst werden.

Ein weiteres Beispiel stellen erfindungsgemäße DNA-Sequenzen dar, die ein Protein kodieren, das zusätzlich zu einem GntI-Enzym eine Mehrzahl, z. B. 10, N-terminal angefügte Histidin-Reste ("His-tag") umfaßt. Eine Isolierung bzw. Reinigung der exprimierten Proteine kann aufgrund der N-terminalen Histidin-Reste leicht durch Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (z. B. Ni-Sepharose) erfolgen (vgl. auch Beispiel 5).

Die Erfindung umfaßt gleichfalls Teile derartiger transgener Pflanzen, entsprechend transformierte Pflanzenzellen, transgene Samen und transgenes Vermehrungsmaterial.

Ein weiterer zentraler Aspekt der Erfindung ist die Verwendung der vorstehend erläuterten Sequenzinformation zur Gewinnung von Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität.

Die Möglichkeiten zum Auffinden von Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität aufgrund eines Gendefektes oder fehlenden Gens durch Einsatz erfindungsgemäßer Antikörper oder erfindungsgemäßer "Screening"- oder Hybridisierungs sonden wurden vorstehend bereits beschrieben.

Zwei weitere Möglichkeiten bestehen in der erfindungsgemäßen Verwendung von "antisense"- bzw. "sense"-DNA-Konstrukten, die von der DNA-Sequenz eines GntI-Gens einer Pflanze abgeleitet sind, zur Erzeugung transgener Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität mittels "homology-dependent gene silencing" (vgl. Ref. 16, 17). Die DNA-Sequenz, auf die zur Erzeugung der Konstrukte als Ausgangssequenz zurückgegriffen wird, kann dabei von der zu transformierenden Ausgangspflanze selbst oder aber auch von einer anderen Pflanzenvarietät oder -art stammen. Insbesondere finden "antisense"- oder "sense"-Konstrukte, wie sie vorstehend unter den Punkten iii) und iv) erläutert wurden, Verwendung. Die eingesetzten Konstrukte umfassen üblicherweise mindestens 50 bis 200 und mehr Basenpaare.

Insbesondere umfassen die hierfür eingesetzten Konstrukte mindestens 50 bis 200 und mehr Basenpaare mit einer Sequenz, die ausgehend

- von den im Sequenzprotokoll angegebenen cDNA-Sequenzen und/oder den entsprechenden GntI-Genen und/oder
- von den vorstehend erläuterten erfindungsgemäßen abgeleiteten DNA-Sequenzen und/oder DNA-Fragmenten und/oder
- von DNA-Sequenzen insbesondere aus anderen Varietäten und Pflanzenarten, die N-Acetylglucosaminyltransferase I kodieren und aufgrund einer Hybridisierung mit Hybridisierungs- oder "Screening"-Sonden, wie sie vorstehend unter Punkt iii) und iv) definiert wurden, unter stringenten Bedingungen aufgefunden werden können,

abgeleitet wird.

Die Konstrukte enthalten in der Regel einen starken konstitutiven oder induzierbaren, ggf. zusätzlich gewebespezifischen Promotor, unter dessen Kontrolle die "antisense"- oder "sense"-DNA-Sequenzabschnitte stehen.

Bei der Erzeugung transgener Pflanzen durch Integration von "antisense"-Konstrukt(en) in das Pflanzengenom oder durch virale Infektion von Ausgangspflanzen oder -pflanzenzellen durch "antisense"-Konstrukt(e) enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Transkription des "antisense"-Konstrukts oder der "antisense"-Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe ist beabsichtigt, auf RNA-Ebene eine Hybridisierung von Transkripten des GntI-Gens mit Transkripten des "antisense"-DNA-Abschnitts zu erzielen, die die Translation der GntI-mRNA verhindert. Die Folge ist eine transgene Pflanze mit stark verringerten Gehalten an N-Acetylglucosaminyltransferase I und damit einer stark verringerten entsprechenden Enzymaktivität.

Für die erfindungsgemäße Transformation von Pflanzen mit "antisense"-Konstrukten können beispielsweise Konstrukte eingesetzt werden, die mit einer der kompletten, in Fig. 2 und im Sequenzprotokoll aufgeführten cDNAs oder entsprechenden, in der Regel mindestens 50 bis über 200 Basenpaare umfassenden Abschnitten derselben hybridisieren. Insbesondere bevorzugt ist darüberhinaus die Verwendung von Fragmenten, deren Transkripte zusätzlich zu einer Hybridisierung mit einem Teil des 5'-untranslatierten Bereiches der GntI-mRNA führen, an dem oder in dessen Nähe sich normalerweise die Anheftung der Ribosomen vollziehen würde. Beispiele für derartige Konstrukte sind in Fig. 4 gezeigt.

Angesichts des Vorkommens einer Isoform in *Solanum tuberosum* mit wahrscheinlich cytoplasmatischer Lokalisierung aufgrund des fehlenden Membranankers (As 10 bis 29) mit noch unbekannter Funktion kann es wünschenswert sein, lediglich das N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzym zu erfassen, das in den Golgi-Zisternen lokalisiert ist, d. h. nur jenes Enzym, das den Membrananker umfaßt. Ein Grund für diesen Wunsch kann das Bestreben oder im Einzelfalle auch die Notwendigkeit sein, den cytoplasmatischen Metabolismus der Pflanzenzelle, für den die cytoplasmatische N-Acetylglucosaminyltransferase I womöglich von Bedeutung ist, so wenig als möglich zu beeinträchtigen. Zu diesem Zweck können erfindungsgemäß "antisense"-Konstrukte eingesetzt werden, die bzw. deren Transkripte mit einem DNA- oder RNA-Abschnitt des GntI-Gens oder der GntI-mRNA hybridisieren, der einen Teil des 5'-untranslatierten Bereichs und den kodierenden Bereich – einschließlich des Membranankers – umfaßt. Eine Erstreckung des Hybridisierungs-
 10 Bereiches bis Position 266 der cDNA in Fig. 2 und SEQ ID NO: 1 wird in der Regel für den genannten Zweck als unschädlich erachtet.

Bei der Erzeugung transgener Pflanzen durch Integration von "sense"-Konstrukten in das Pflanzengenom oder durch virale Infektion von Ausgangspflanzen oder -pflanzenzellen durch "sense"-Konstrukt(e) enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Expression des oder der Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe wird in Anlehnung an die Arbeiten von Faske et al. (Ref. 17) in Tabak von Hybridisierungsphänomenen dieser Konstrukte mit dem endogenen GntI-Gen auf posttranskriptionaler bzw. auf DNA-Ebene ausgegangen, die letztlich die Translation des GntI-Gens beeinträchtigen oder verhindern. Das Resultat sind auch in diesem Falle transgene Pflanzen mit verminderter oder sogar fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität.

Verfahren zur stabilen Integration derartiger "antisense"- und "sense"-Konstrukte in das Genom von Pflanzen bzw. zur viralen Infektion von Pflanzen bzw. Pflanzenzellen für eine extrachromosomale Propagation und Transkription/Expression derartiger Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe sind dem Fachmann bekannt. Dazu gehören sowohl der direkte DNA-Transfer (z. B. in Protoplasten mittels Elektroporation oder durch Zusatz eines hochmolekularen Osmotikums sowie biolistische Methoden, bei denen DNA-umhüllte Teilchen in Pflanzengewebe geschossen werden) wie die Verwendung natürlicher Wirt/Vektor-Systeme (z. B. Agrobakterien oder Pflanzenviren). Für eine virale Infektion von Ausgangspflanzen oder -pflanzenzellen durch entsprechende Konstrukte enthaltende Viren für eine extrachromosomale Propagation und Transkription/Expression der Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe stehen eine Reihe spezieller Viren, wie Tabakmosaikvirus (TMV) oder Kartoffelvirus X (potato virus X), zur Verfügung.

Beispielhafte Pflanzen, die für eine derartige Integration in Frage kommen, umfassen dikotyledone wie monokotyledone Kulturpflanzen, insbesondere Solanaceen wie Kartoffel, Tabak, Tomate und Paprika. Zusätzlich wären Banane, Luzerne, Raps, Rüben, Soja, Salat, Mais, Reis und Getreide geeignete Zielpflanzen für den Einsatz homologer "antisense"-Konstrukte. Beispielsweise erscheint die im Sequenzprotokoll angegebene Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* insbesondere als Ausgangssequenz für die erfindungsgemäße Transformation von Brassicaceen, wie z. B. Rapspflanzen, mittels "sense"- oder "antisense"-Konstrukten geeignet. Weitere Pflanzen von Interesse sind jegliche Pflanzen, die für Medizin und Forschung interessante Glykoproteine exprimieren.

Allgemein soll festgehalten werden, daß die erfindungsgemäße Transformation von Pflanzen, die in dem entsprechenden Bereich des GntI-Gens eine Homologie von $\geq 70\%$ auf Nukleotidebene zu den eingesetzten erfindungsgemäßen "antisense"- oder "sense"-Konstrukten aufweisen, in der Regel zu erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen führt, die die gewünschte Verringerung der N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität aufweisen.

Eine weitere Möglichkeit wird ferner in einer zielgerichteten Zerstörung ("Knock out") des N-Acetylglucosaminyltransferase I-Gens durch "gene targeting" mittels homologer Rekombination (Ref. 24) in einer Zielpflanze durch Einsatz eines geeigneten, von der erfindungsgemäßen cDNA-Sequenz abgeleiteten DNA-Fragments gesehen, ähnlich der Vorgehensweise, wie sie beispielsweise für Hefe-Systeme und Säuger etabliert worden ist.

Die Erfindung umfaßt ferner transgene Pflanzen, die mit den vorstehend angesprochenen "antisense"- oder "sense"-Konstrukten bzw. mit diese enthaltenden Viren transformiert worden sind, sowie Teile derartiger transgener Pflanzen, entsprechend transformierte Pflanzenzellen, transgene Samen und transgenes Vermehrungsmaterial.

Verfahren zur Erzeugung transgener Pflanzen, z. B. durch Agrobakterien- oder Virus-vermittelten, wie auch direkten DNA-Transfer, sind dem Fachmann geläufig. Hinsichtlich beispielhafter Pflanzen für eine derartige Transformation gilt das vorstehend ausgeführte.

Die erfindungsgemäßen bzw. erfindungsgemäß gewonnenen Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität können erfindungsgemäß zur Herstellung von Glykoproteinen mit minimalen und einheitlichen, also definierten Zuckerresten eingesetzt werden. Wie bereits erläutert, sind derartige Glykoproteine für Medizin und Forschung von großer Bedeutung. Als preiswerte Rohstoff- und Nahrungsquelle sowie durch ihre problemlose Entsorgung über Kompostierung stellen Pflanzen per se ideale Bioreaktoren dar. Gemäß der vorstehend erläuterten Erfindung können jetzt biotechnologisch oder pharmazeutisch relevante Glykoproteine (z. B. Therapeutika mit niedrigem Antigenpotential für Säuger) in Kulturpflanzen exprimiert werden, in denen GntI-Aktivität stark gedrosselt ist oder vollständig fehlt.

Die Erfindung umfaßt dementsprechend auch ein Verfahren zur Erzeugung von Glykoproteinen mit minimalen, einheitlichen und definierten Zuckerresten, umfassend das Züchten einer erfindungsgemäßen transgenen Pflanze, von Teilen derartiger Pflanzen oder von erfindungsgemäßen transformierten Pflanzenzellen, die jeweils das gewünschte Glykoprotein exprimieren, und das Isolieren des gewünschten Glykoproteins aus dem gezüchteten Material.

Beispielhafte Kulturpflanzen sind in diesem Zusammenhang Solanaceen, insbesondere Kartoffel, Tabak, Tomate, und Paprika. Des weiteren kommen Banane, Luzerne, Raps, Rüben, Soja, Salat, Mais, Reis und Getreide in Frage.

Die Sequenz der enzymatisch gesteuerten, pflanzenspezifischen N-Glykan-Modifikationen, denen sekretorische Glykoproteine bei Passage durch den Golgi-Apparat höherer Pflanzen unterliegen, ist in Fig. 1 schematisch dargestellt. Die Blockierung der Biosynthese durch fehlende oder unzureichende N-Acetylglucosaminyltransferase I-(GlcNAc-Transferase I) -Aktivität in einer Pflanze führt dazu, daß anstelle "komplexer" Glykane hauptsächlich Glykane des Man₅GlcNAc₂-Typs, also Glykoproteine mit einheitlichen und wohldefinierten Zuckerresten gebildet werden, die für Medizin und Forschung von überaus hoher Bedeutung sind.

Hierzu können die Gene für die gewünschten Glykoproteine in ihren natürlichen Erzeugerpflanzen exprimiert werden, die erfindungsgemäß z. B. mittels "antisense"- oder "sense"-Konstrukten zu transgenen Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität transformiert wurden.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, erfindungsgemäße transgene Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität einzusetzen, die zusätzlich mit dem Gen für das gesuchte Glykoprotein transformiert worden sind. Hierzu können Konstrukte eingesetzt werden, die das Gen für das gesuchte Glykoprotein unter der Kontrolle eines starken, konstitutiven oder induzierbaren, ggf. zusätzlich gewebespezifischen Promotors enthalten und die zu einer Integration des Gens in das Genom der Pflanze führen. Alternativ kann die Transformation auch durch virale Infektion durch ein das Gen für das gesuchte Glykoprotein enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Expression des Gens erfolgen. Das Glykoprotein kann dann in der jeweiligen Wirtspflanze exprimiert und daraus gewonnen werden.

Es kann dabei selbstverständlich alternativ auch so vorgegangen werden, daß zunächst eine Transformation mit einem Expressionskonstrukt oder Virus, das die kodierende DNA des Glykoproteins enthält, vorgenommen wird und erst danach eine weitere Transformation mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen "antisense"- oder "sense"-Konstrukten oder einem oder mehreren Viren, die entsprechende DNA enthalten, erfolgt. Eine gleichzeitige Transformation mit beiden Konstrukten oder mit einem Virus, das sowohl das "antisense"- oder "sense"-Konstrukt als auch das gesuchte Glykoprotein kodierende Gen enthält, ist ebenfalls möglich ("Huckepack"-Version).

Im Rahmen der Erfindung wird auch eine virale Überinfektion erfindungsgemäßer transgener Pflanzen, bei denen bereits eine Integration des "antisense"/"sense"-Konstrukts und/oder des das gesuchte Glykoprotein kodierenden Gens im Genom vorliegt, durch Viren, die "antisense"/"sense"-Konstrukt und/oder das das gesuchte Glykoprotein kodierende Gen enthalten, für eine zusätzliche extrachromosomale Propagation und Transkription bzw. Expression dieser DNA in Betracht gezogen. Hierdurch können die Konzentrationen an "antisense"- bzw. "sense"-DNA oder exprimiertem Glykoprotein in den transgenen Pflanzenzellen erhöht werden.

Für die erfindungsgemäße Gewinnung definiert glykosylierter Glykoproteine kann sich eine Verwendung gewebespezifischer Promotoren beispielsweise in Fällen als sinnvoll erweisen, wenn beabsichtigt ist, die gewünschten Glykoproteine nur aus bestimmten Pflanzenteilen, wie der Knolle oder den Wurzeln, zu gewinnen. Für eine ganze Reihe von Pflanzengewebe stehen heute gewebespezifische Promotoren zur Verfügung, die eine Expression von Fremdgenen speziell nur in diesen Geweben bewirken. Beispielhaft können hier knollenspezifische Promotoren, wie Patatin Klasse I- (Ref. 26) und Proteinase Inhibitor II-Promotoren (Ref. 27) aufgeführt werden. Beide Promotoren zeigen unter bestimmten Bedingungen ebenfalls Expression in Blattgewebe, d. h. können durch hohe Metabolitgehalte (wie z. B. Saccharose) und im Fall des Proteinase Inhibitor II-Promotors auch durch mechanische Verwundung oder Besprühen mit Abscisin- bzw. Jasmonsäure induziert werden.

Eine Verwendung gewebespezifischer Promotoren kann auch dann angezeigt sein, wenn sich die für die Transformation eingesetzte erfindungsgemäße DNA-Sequenz bzw. deren Transkriptions- oder Translationsprodukte für bestimmte Pflanzenteile als abträglich erweisen, z. B. durch negative Einwirkung auf den Metabolismus der entsprechenden Pflanzenzellen.

Als beispielhaftes Ziel-Glykoprotein kommt humane Glucocerebrosidase zur Therapie der erblichen "Gaucher"-Krankheit (Ref. 25) in Frage. Zur Gewinnung von humaner Glucocerebrosidase (GC) mit einheitlichen und definierten Zuckerresten können beispielsweise erfindungsgemäße mittels "antisense"-DNA transformierte Pflanzen mit dem Gen für humane Glucocerebrosidase transformiert werden. Dafür wird die cDNA-Sequenz für humane Glucocerebrosidase (Ref. 38) mittels PCR unter Verwendung genspezifischer Primer am 3'-Ende so modifiziert, daß das rekombinante Enzym eine C-terminale Sequenzverlängerung trägt, die einen Affinitätsmarker (z. B. AWRHPQFGG, "Strep-tag"; Ref. 39) und gegebenenfalls auch eine Protease-Erkennungsstelle (z. B. IEGR) zwischen GnTI-Enzymabschnitt und Affinitätsmarker kodiert. Die so veränderte GC-cDNA-Sequenz wird unter Verwendung eines starken und ggf. gewebespezifischen Promotors (z. B. für Kartoffel unter Kontrolle des knollenspezifischen B33-Patatin-Promotors) in erfindungsgemäßen GnTI-antisense-Pflanzen exprimiert, so daß das in diesen Pflanzen synthetisierte Enzym ausschließlich wohldefinierte N-Glykane trägt. Der Affinitätsmarker soll die Anreicherung des rekombinanten Enzyms aus den transgenen Pflanzen erleichtern. In diesem Falle binden die exprimierten Proteinmoleküle ("GC-Strep"-Moleküle) über die Affinitätsmarkersequenz an eine Streptavidin-derivatisierte Matrix und können von dieser mittels Biotin oder Biotinderivaten abgelöst werden. Die Ablösung von der Streptavidin-derivatisierten Matrix kann auch mittels katalytischer Mengen einer Protease erfolgen, die eine Spezifität für die zwischen dem GnTI-Enzymabschnitt und dem Affinitätsmarker befindliche Protease-Erkennungsstelle aufweist. In diesem Falle wird nur der GnTI-Enzymabschnitt von der Matrix abgelöst. Dies kann insbesondere in dem Falle von Vorteil sein, wenn die Affinitätsmarkersequenz eine nachteilige Wirkung auf die GnTI-Aktivität ausübt.

Die Man₅GlcNAc₂-Glykane der aus den erfindungsgemäßen Pflanzen gewonnenen Glucocerebrosidase werden aufgrund ihrer terminalen Mannose-Reste von Makrophagen als Aufnahmesignal erkannt und können daher direkt zur Therapie der erblichen "Gaucher-Krankheit" eingesetzt werden. Eine Therapie ist derzeit nur durch aufwendige Isolierung und Deglykosylierung nativer Glucocerebrosidase möglich (Ref. 25).

Die Herstellung rekombinanter Glykoproteine läßt sich dementsprechend durch den Einsatz pflanzlicher GnTI-Sequenzen im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren, z. B. der technisch aufwendigen chemischen Deglykosylierung gereinigter Glykoproteine (Ref. 25) oder einer schwierigen und teuren Produktion in GnTI-defizienten tierischen Zelllinien (Ref. 7, 10), stark vereinfachen.

Erläuterung der Figuren

Fig. 1 Sequenz der pflanzenspezifischen N-Glykan-Modifikationen, denen sekretorische Glykoproteine bei Passage durch den Golgi-Apparat höherer Pflanzen unterliegen (Ref. 28). Der Biosyntheseblock zu "komplex"-modifizierten Glykanen beruht auf einem Defizit an GnTI-Aktivität (hervorgerufen entweder durch defektes oder fehlendes GnTI-En-

zym oder durch effektive Drosselung der GntI-Genexpression) und ist durch ein Kreuz markiert. Bedeutung der Symbole: (F) Fucose-Reste, (X) Xylose-Reste, (●) GlcNac-Reste, (□) Mannose-Reste.

Fig. 2 Vollständige cDNA-Sequenz einer pflanzlichen GntI aus Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) und davon abgeleitete Aminosäuresequenz. Exemplarisch ist die vollständige cDNA der GntI-Isoform mit Membrananker aus Kartoffelblattgewebe (A1) dargestellt. Die EcoRI/NotI-Linker an den 5'- und 3'-Enden der cDNA sind durch Fettdruck hervorgehoben, die Bindestellen der für die RT-PCR-Sonde verwendeten degenerierten Oligonukleotide sind unterstrichen. Im Gegensatz zu bereits publizierten tierischen GntI-Sequenzen enthält die abgeleitete Proteinsequenz der Kartoffel cDNA-Klone eine potentielle N-Glykosylierungsstelle: Asn-X(ohne Pro)-Ser/Thr, die mit einem Stern markiert ist. Die Region des Membranankers ist kursiv hervorgehoben (As 10 bis 29). Der Beginn der möglicherweise im Cytosol lokalisierten Isoform (A8) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Fig. 3 A, Identitäts- bzw. Ähnlichkeitsgrad der abgeleiteten Aminosäuresequenz einer vollständigen GntI-cDNA-Sequenz aus Kartoffel (A1) im Vergleich mit anderen, aus Datenbanken ausgewählten GntI-Sequenzen tierischer Organismen. Identische Aminosäurepositionen (in %) sind fett gedruckt, ähnliche Aminosäurepositionen stehen in Klammern darunter. Bedeutung der Kürzel: Hu, Mensch; Ra, Ratte; Mo, Maus; Ce, *Caenorhabditis elegans* (Spulwurm); St, *Solanum tuberosum* (Kartoffel).

B, Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen verschiedener pflanzlicher GntI-cDNA-Klone. A_Stb-A1, GntI aus Kartoffelblatt; B_Ntb-A9, GntI aus Tabakblatt (A9); c_At6-Pcr, GntI-Teilsequenz aus *Arabidopsis thaliana* Blatt-mRNA (146 As). Identische As sind schwarz, ähnliche As hellgrau markiert.

Fig. 4 Klonierungsschema der verwendeten GntI-"antisense"-Konstrukte. In die SalI-Schnittstelle der Polylinkerregion des pflanzlichen Expressionsvektors pA35 (Ref. 29) wurde nach Auffüllen der Enden ein NotI-Linker eingeführt (= pA35N) und die vollständige A1-GntI-cDNA über NotI in pA35N inseriert. Das entsprechende "antisense"-Konstrukt (= pA35N-A1as) wurde über EcoRI und HindIII in den binären Vektor pBin19 (Ref. 30) inseriert. Des weiteren wurde nach PCR-Amplifikation ein ca. 270 Bp umfassendes 5'-Fragment der A1-GntI-cDNA über XbaI- und NotI-Schnittstellen in pA35N in "antisense"-Orientierung kloniert (= pA35N-A1-kurz) und ebenfalls in pBin19 inseriert. Abkürzungen: Zahlen in Klammern, Positionsangaben der Restriktionsschnittstellen in der A1-GntI-cDNA (in Basenpaaren); pBSK, Klonierungsvektor (Stratagene); pGEM3Z, Klonierungsvektor (Promega); CaMV p3sS, konstitutiver Blumenkohl-Mosaikvirus-35S-Promotor; OCSpA, Octopinsynthese-Polyadenylierungssignal; pNOS, Nopalinsynthese-Promotor; NEO, Neomycinphosphotransferase (Selektionsmarker, vermittelt Kanamycinresistenz); NOSpA, Nopalinsynthese-Polyadenylierungssignal; LB/RB, "left/right border" der T-DNA des binären Vektors; Pfeil, Translationsstart (ATG); A8, Beginn der potentiell cytosolisch lokalisierten GntI-Isoform (7 As-Austausche im Vergleich zu A1).

Erläuterung der im Text verwendeten Abkürzungen

As, Aminosäure(n); Bp, Basenpaar(e); EMS, Ethylmethansulfonat (mutagene Chemikalie); F2, zweite Filialgeneration; Fuc, Fucose; Glc, Glucose; GlcNac, N-Acetylglucosamin; GntI, N-Acetylglucosaminyltransferase I (EC 2.4.1.101); GntI, Gen für GntI (Kern-codiert); Man, Mannose; PCR, Polymerasekettenreaktion; PAGE, Polyacrylamid-gelelektrophorese; Ref., Referenz; RT-PCR, Reverse Transkription gekoppelt mit Polymerasekettenreaktion; SDS, Natriumdodecylsulfat; Var., Varietät; Xyl, Xylose.

Die Erfindung wird nun anhand von Beispielen eingehender erläutert. Die Beispiele werden lediglich zur Veranschaulichung der Erfindung aufgeführt und beschränken die Erfindung in keiner Weise.

Bsp. 1: Isolierung und Charakterisierung von pflanzlichen GntI-cDNA-Klonen.

Aus Kartoffel- und Tabak-Blattgewebe wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels RT-PCR in Kombination mit degenerierten Primern (Vorgehen analog zu Ref. 31), die von konservierten Aminosäurebereichen bekannter GntI-Sequenzen aus tierischen Organismen abgeleitet wurden ("sense"-Primer 1*, 5'-TG(CT) G(CT)I (AT) (GC)I GCI TGG (AC)A(CT) GA(CT) AA(CT)-3'; "antisense"-Primer 3*, 5'-CCA ICC IT(AG) ICC (ACGT)G(CG) (AG)AA (AG)AA (AG)TC-3'; je 30 pMol Primer pro 50 µl PCR-Ansatz bei 55°C "annealing"-Temperatur und 45 Zyklen), cDNA-Fragmente von ca. 90 Bp amplifiziert. Nach Gelelektrophorese wurden die Enden der PCR-Produkte repariert (d. h. durch DNA-Polymerase I glatte Enden erzeugt und mit T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert) und in die EcoRV-Schnittstelle von pBSK (Stratagene) kloniert. Die Identität der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Kartoffel und Tabak RT-PCR-Produkte konnte durch Vergleich mit bekannten GntI-Sequenzen zwischen den Primern (Pfeile) als homolog bestätigt werden; $\Rightarrow Q(R/M)QFVQDP(D/Y)ALYRS \Leftarrow$ (homologe As unterstrichen). Von je einem der Klone wurden mittels PCR radioaktiv markierte Sonden synthetisiert (Standard-PCR-Ansatz mit degenerierten Primern wie oben, Nukleotidmischung ohne dCTP, dafür mit 50 µCi α -³²P-dCTP [>3000 Ci/mMol] versetzt) und verschiedene cDNA-Banken mit den entsprechenden homologen Kartoffel- bzw. Tabak-Sonden auf GntI-haltige Klone durchgemustert (Vorgehen analog zu Ref. 31; "stringente" Hybridisierungsbedingungen wurden bereits oben im Text definiert). Die cDNA-Banken wurden mit mRNA aus jungen, noch wachsenden Pflanzenteilen ("sink"-Gewebe) hergestellt. Nach cDNA-Synthese und Ligieren von EcoRI/NotI-Adaptoren (cDNA-Synthese-Kit, Pharmacia) wurde mit EcoRI-kompatiblen Lambda-Armen ligiert, diese verpackt und damit E. coli XL1-Blue-Zellen transfiziert (Lambda ZAPII Klonierungs- und Verpackungssystem, Stratagene). Nach Amplifikation der Banken wurde je ein vollständiger GntI-Klon aus einer Kartoffelblatt-"sink"-Bank (A1 gemäß Fig. 2 und SEQ ID NO: 1) und einer Tabakblatt-"sink"-Bank (A9 gemäß SEQ ID NO: 3), sowie zwei weitere Klone aus einer Knollen-"sink"-Bank isoliert (A6, A8). Die abgeleiteten GntI-Aminosäuresequenzen enthalten im Gegensatz zu denen von Tieren eine potentielle N-Glykosylierungsstelle, Asn-X(ohne Pro)-Ser/Thr. Eine der GntI-cDNA-Sequenzen aus Knollen trägt vor dem ersten Methionin Stop-Codons in allen drei Leserahmen (A8). Der codierende Bereich ist zu dem längeren Knollenklon (A6) stark homolog (nur 2 As-Austausche), trägt jedoch eine völlig andere 5'-untranslatierte Region. Des weiteren fehlt der für das Golgi-Enzym charakteristische Membrananker, so daß diese GntI-Isoform im Cytosol lokalisiert sein könnte. Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe der "gap"- bzw. "pileup"- und "box"-Option des GCG-"software"-Pakets (J Devereux, P Haeblerli, O Smithies (1984) Nucl Acids Res 12: 387-395) erstellt und zeigen, daß die abgeleiteten pflanzlichen GntI-Aminosäuresequenzen zu denen aus tierischen Organismen nur

30–40% Identität und 57–59% Ähnlichkeit aufweisen (Fig. 3A), untereinander aber hoch homolog sind ($\geq 90\%$, Fig. 3B).

Bei *Arabidopsis thaliana* wurde analog vorgegangen, wobei die erhaltene GntI-Teilsequenz durch RT-PCR mit GntI "sense"-Primer 4A (5'-ATCGGAAAGCTTGGATCC CCA GTG GC(AG) GCT GTA GTT GTT ATG GCT TGC-3'; HindIII-Schnittstelle unterstrichen, BamHI fett gedruckt) und "antisense"-Primer 3* wie vorstehend definiert, amplifiziert wurde. Die durch Sequenzierung ermittelte Nukleinsäuresequenz ist in SEQ ID NO: 5 aufgeführt.

Bsp. 2: Funktionelle Komplementierung eines GntI-Defekts mit GntI-cDNA bei transienter Expression in Protoplasten der *Arabidopsis thaliana* Cgl-Mutante.

Ca. 4 Wochen nach Aussaat wurden Protoplasten aus Blättern steril angezogener cgl-Mutanten ("Nichtfärber"-Pflanzen nach 5 Rückkreuzungen, Ref. 13) isoliert und mit Expressionskonstrukten der vollständigen GntI-cDNA-Sequenzen (NotI-cDNA-Fragmente, vgl. Fig. 4) in "sense"- (pA35N-A1s bzw. pA35N-A9s) oder "antisense"-Orientierung (pA35N-A1as bzw. pA35N-A9as) transformiert und für 96 Std. bei Raumtemperatur abgedunkelt kultiviert (je 50 µg Plasmid-DNA pro 1 Mio. Protoplasten, PEG-Methode nach Ref. 32). Anschließend SDS-PAGE der Protoplastenextrakte und "Western Blot"-Analyse (analog zu Ref. 13, 33) zeigte funktionelle Komplementierung des GntI-Defekts, d. h. "komplexe" Glykosylierung zahlreicher Proteinbanden bei transienter Expression der Kartoffel A1- und Tabak A9-"sense"-, nicht aber der entsprechenden "antisense"-Konstrukte in Protoplasten der *Arabidopsis* Cgl-Mutante (Daten nicht gezeigt).

Bsp. 3: Klonierung der binären Expressionskonstrukte pBin-35-A1as und pBin-35-A1-kurz (vgl. Fig. 4).

In die SalI-Schnittstelle der Polylinkerregion (entspricht puc18) des pflanzlichen Expressionsvektors pA35 (Ref. 29) wurde nach Auffüllen der Enden ein NotI-Linker eingeführt (pA35N), und die vollständige A1-GntI-cDNA (Nukleotide 9 bis 1657, gemäß der cDNA in Fig. 2) über NotI in pA35N inseriert ("sense"-Konstrukt pA35N-A1s bzw. "antisense"-Konstrukt pA35N-A1as). Die Expressionskassetten der "sense" bzw. "antisense"-Konstrukte wurden über die terminalen Schnittstellen (NcoI-Schnittstelle aufgefüllt, mit HindIII partial nachverdaut) als ca. 2410 Bp-Fragment isoliert und in die EcoRI- (aufgefüllt) und HindIII-Schnittstellen des binären Vektors pBin19 (Ref. 30) inseriert (= pBin-35-A1s bzw. pBin-35-A1as). Durch Fusion mit der ebenfalls aufgefüllten NcoI-Schnittstelle wird die EcoRI-Schnittstelle des Vektors regeneriert. Zusätzlich wurde in einem Standard-PCR-Ansatz ("sense"-Primer: KS-Sequenzprimer (Stratagene), verlängert für PCR, 5'-GGC CCC CCC TCG AGG TCG ACG GTA TCG- 3'; "antisense"-Primer: 5'-GGGCCTCTAGACTCGAG AGC (CT)AC TAC TCT TCC TTG CTG CTG GCT AAT CTT G-3', XbaI-Schnittstelle unterstrichen, XhoI-Schnittstelle kursiv) bei 50°C "annealing"-Temperatur ein 5'-Fragment der GntI-cDNA amplifiziert (Nukleotide 9 bis 261, gemäß der cDNA in Fig. 2 und SEQ ID NO: 1). Das PCR-Produkt wurde mit XbaI (im "antisense"-Primer) und NotI (im 5'-Linker der cDNA) verdaut, als ca. 260 Bp-Fragment isoliert und in pA35N kloniert (= pA35N-A1-kurz). Die Expressionskassette des kurzen "antisense"-Konstrukts wurde als EcoRI/HindIII-Fragment (ca. 1020 Bp) ebenfalls in pBin19 inseriert (= pBin-35-A1-kurz).

Bsp. 4: Transformation von Agrobakterien durch die binären GntI-Konstrukte und Regeneration von transgenen Kartoffel- bzw. Tabakpflanzen aus infizierten Blattscheiben.

Die binären "antisense"-GntI-Konstrukte (pBin-35-A1as bzw. pBin-35-A1-kurz) wurden in den Agrobakterien-Stamm GV2260 transformiert (Ref. 34, 35). Mit den rekombinanten Agrobakterienlinien wurden exemplarisch sterile Blattscheiben von Kartoffelpflanzen der Var. Désirée bzw. Tabakpflanzen der Var. Wisconsin 38 infiziert (50 µl einer frischen Übernachtskultur in 10 ml flüssigem 2MS-Medium: 2% Saccharose in Murashige & Skoog Salz/Vitamin-Standard-Medium, pH 5,6; Blattstückchen ohne Mittelrippen; Kokultivierung 2 Tage dunkel in Pflanzen-Klimakammern). Nach Waschen der infizierten Blattstückchen in 2MS-Medium mit 250 µg/ml Claforan wurden aus diesen in Gewebekultur unter Kanamycin-Selektion transgene Pflanzen regeneriert (Kartoffelprotokoll Ref. 26; Tabakprotokoll Ref. 36) und auf reduzierte GntI-Aktivität getestet (Daten nicht gezeigt).

Bsp. 5: Gewinnung von rekombinantem Kartoffel-GntI-Protein (zur Antikörperproduktion).

Mit Hilfe des pET-Systems (Novagen) wurde rekombinante GntI mit 10 zusätzlichen N-terminalen Histidin-Resten ("His-tag") in *E. coli* erzeugt und durch Metall-Chelat-Affinitätschromatografie gereinigt. Ein cDNA-Fragment, das die Nukleotide 275–1395 der Kartoffel GntI-cDNA umfaßt (entsp. As 75–446, Fig. 2 bzw. SEQ ID NO: 1 und 2), wurde mittels Standard-PCR ("annealing"-Temperatur 50°C, 30 Zyklen, Ref. 31) amplifiziert ("sense"-Primer GntI-5'fus: 5'-CATGGATCC CTC GAG AAG CGT CAG GAC CAG GAG TGC CGG C-3'; "antisense"-Primer GntI-3'stop: 5'-ATCCCGGGATCCG CTA CGT ATC TTC AAC TCC AAG TTG-3'; XhoI- bzw. BamHI Schnittstellen unterstrichen, Stop-Codon kursiv), und über die Restriktionsschnittstellen der synthetischen Primer (5'-XhoI-GntI-BamHI-3') in den Vektor pET16b (Novagen) inseriert (= pET-His-A1). Nach Vermehrung und Analyse in *E. coli* XLI-Blue (Stratagene) wurde das Konstrukt als Glycerinkultur archiviert. Zur Überexpression wurden kompetente *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen (Novagen) mit pET-His-A1 transformiert. Zugabe von IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid, ad 0,5–2 mM) zu einer logarithmisch wachsenden BL21-Kultur induziert zunächst die Expression von (bakterienchromosomaler) T7-RNA-Polymerase und damit ebenfalls die Expression des rekombinanten Fusionsproteins, das in pET-Vektoren (Novagen) unter T7-Promotor-Kontrolle steht. Aus induzierten BL21:pET-His-A1-Zellen wurde rekombinante Kartoffel-GntI mit "His-tag" unter denaturierenden Bedingungen (Hersteller-Protokoll, Novagen) mittels Metall-Chelat-Chromatographie an TALON-Matrix (Clontech) gereinigt und die Präparation mittels SDS-PAGE auf Einheitlichkeit überprüft.

Bsp. 6: Erzeugung von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen.

Rekombinante Kartoffel-GntI (aus Bsp. 5) wurde als Antigen verwendet. Nach Entnahme von einigen Millilitern Prä-Immunserum wurde den Kaninchen in dreiwöchigen Abständen 300–500 µg affinitätsgereinigtes Protein zusammen mit 25 µg GMDP-Adjuvans (Gerbu) subcutan injiziert. Nach drei Basis-Injektionen wurden die Tiere 12 bis 14 Tage nach der jeweiligen Folge-Injektion ("Boost") aus der Ohrvene geblutet, das Serum gewonnen (Ref. 37) und auf Erkennung pflanzlicher GntI in "Western Blot"-Analysen (1 : 200 bis 1 : 2000-Verdünnung) getestet. Das Antiserum der "Boosts" mit geringstem Hintergrund-zu-Signal-Verhältnis wurde mit 0,04% Natriumazid versetzt, aliquotiert und bei +4°C bzw. längerfristig bei –20°C gelagert.

- 1) R Kornfeld, S Kornfeld (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54: 631–664
- 5 2) GP Kaushal, T Szumilo, AD Elbein (1988). Structure and biosynthesis of plant N-linked glycans. In J Preiss (editor) *The Biochemistry of Plants*, Vol 14: Carbohydrates. Academic Press, San Diego, CA, pp 421–463
- 3) L Faye, MJ Chrispeels (1989) Apparent inhibition of β -fructosidase secretion by tunicamycin may be explained by breakdown of the unglycosylated protein during secretion. *Plant Physiol* 89: 845–851
- 4) TW Rademacher, RB Parekh, RA Dwek (1988) Glycobiology. *Annu Rev Biochem* 57: 785–838
- 10 5) A Sturm (1991) Heterogeneity of the complex N-linked oligosaccharides at specific glycosylation sites of 2 secreted carrot glycoproteins. *Eur J Biochem* 199: 169–179
- 6) K Olden, BA Bernard, MJ Humphries, T Yeo, SL White, SA Newton, HC Bower, JB Parent (1985) Function of glycoprotein glycans. *Trends Biochem Sci* 10: 78–82
- 7) P Stanley (1989) Chinese hamster ovary cell mutants with multiple glycosylation defects for production of glycoproteins with minimal carbohydrate heterogeneity. *Mol Cell Biol* 9: 377–383.
- 15 8) R Kumar, J Yang, RD Larsen, P Stanley (1990) Cloning and expression of N-acetylglucosaminyltransferase I, the medial Golgi transferase that initiates complex N-linked carbohydrate formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9948–9952
- 9) JW Dennis, S Laferte, C Waghome, ML Breitman, RS Kerbel (1987) β →6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science* 236: 582–585
- 20 10) MN Fukuda (1990) HEMPAS disease: genetic defect of glycosylation. *Glycobiology* 1: 9–15
- 11) MN Fukuda, KA Masri, A Dell, L Luzzatto, KW Moremen (1990) Incomplete synthesis of N-glycans in congenital dyserythropoetic anemia type II caused by a defect in the gene encoding α -mannosidase II. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7443–7447
- 25 12) M Laurière, C Lauriere, MJ Chrispeels, KD Johnson, A Sturm (1989) Characterization of a xylose-specific antiserum that reacts with the complex asparagine-linked glycans of extracellular and vacuolar glycoproteins. *Plant Physiol* 90: 1182–1188
- 13) A von Schaewen, A Sturm, J O'Neill, MJ Chrispeels (1993) Isolation of a mutant Arabidopsis plant that lacks N-acetyl glucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Golgi-modified complex N-linked glycans. *Plant Physiol* 102: 1109–1118
- 30 14) JK-C Ma, MB Hein (1995) Plant antibodies for immunotherapy. *Plant Physiol* 109: 341–346
- 15) AS Moffat (1995) Medical applications: Exploring transgenic plants as a new vaccine source. *Science* 268: 658–660 (Zusammenfassung von zwei Originalveröffentlichungen in derselben Ausgabe)
- 16) CB Taylor (1997) Comprehending cosuppression. *Plant Cell* 9: 1245–1249 (Zusammenfassung von mehreren Originalveröffentlichungen in derselben Ausgabe)
- 35 17) M Faske, JE Backhausen, M Sendker, M Singer-Bayrle, R Scheibe, A von Schaewen (1997) Transgenic tobacco plants expressing pea chloroplast Nmdh cDNA in sense and antisense orientation: Effects on NADP-MDH level, stability of transformants, and plant growth. *Plant Physiol* 115: 705–715
- 18) R Koes, E Souer, A van Houwelingen, L Mur, C Spelt, F Quattrocchio, J Wing, B Oppedijk, S Ahmed, T Maes, T Gerats, P Hoogveen, M Meesters, D Kloos, JNM Mol (1995) Targeted gene inactivation in petunia by PCR-based selection of transposon insertion mutants. *Proc Acad Sci USA* 92: 8149–8153
- 40 19) EC McKinney, N Ali, A Traut, KA Feldmann, DA Belostotsky, JM McDowell, RB Meagher (1995) Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in Arabidopsis: actin mutants act2-1 and act4-1. *Plant J* 8: 613–622
- 20) F Altmann, G Kornfeld, T Dalik, E Staudacher, J Glössl (1993) Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells. N-acetylglucosaminyl transferase I and II activities in cultured lepidopteran cells. *Glycobiology* 3: 619–625
- 45 21) A Sturm, KD Johnson, T Szumilo, AD Elbein, MJ Chrispeels (1987) Subcellular localization of glycosidases and glycosyltransferases involved in the processing of N-linked oligosaccharides. *Plant Physiol* 85: 741–745
- 22) GM Church, W Gilbert (1984) Genomic sequencing. *Proc Acad Sci USA* 81: 1991–1995
- 50 23) J Sambrook, EF Fritsch, T Maniatis (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd edn), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- 24) H Puchta, B Hohn (1996) From centiMorgans to base pairs: homologous recombination in plants. *Plant Sci* 1: 340–348
- 55 25) NW Barton, FS Furbish, GJ Murray, M Garfield, RO Brady (1990) Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1913–1916
- 26) M Rocha-Sosa, U Sonnewald, W-B Frommer, M Stratmann, J Schell, L Willmitzer (1989) Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J* 8: 23–29
- 27) T Hildmann, M Ebner, H Pena-Cortes, JJ Sanchez-Serrano, L Willmitzer, S Prat (1992) General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4: 1157–1170
- 60 28) KD Johnson, MJ Chrispeels (1987) Substrate specificities of N-acetylglucosaminyl-, fucosyl-, and xylosyltransferases that modify glycoproteins in the Golgi apparatus of bean cotyledons. *Plant Physiol* 84: 1301–1308
- 29) H Höfte, L Faye, C Dickinson, EM Herman, MJ Chrispeels (1991) The protein-body proteins phytohemagglutinin and tonoplast intrinsic protein are targeted to vacuoles in leaves of transgenic tobacco. *Planta* 184: 431–437
- 65 30) M Bevan (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucl Acids Res* 12: 8711–8721
- 31) K Graeve, A von Schaewen, R Scheibe (1994) Purification, characterization and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J* 5: 353–361
- 32) B Damm, R Schmidt, L Willmitzer (1989) Efficient transformation of Arabidopsis thaliana using direct gene

transfer to protoplasts. *Mol Gen Genet* 213: 15–20

33) A von Schaewen, M Stitt, R Schmidt, L Willmitzer (1990) Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate, inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. *EMBO J.* 9: 3033–3044

34) R Deblaere, B Bytebier, H De Greve, F Debroeck, J Schell, M van Montagu, J Leemans (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium* mediated gene transfer to plants. *Nucl Acids Res* 13: 4777–4788

35) R Höfgen, L Willmitzer (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucl Acids Res* 16: 9877

36) T Voelker, A Sturm, MJ Chrispeels (1987) Differences in expression between two seed lectin alleles obtained from normal and lectin-deficient beans are maintained in transgenic tobacco. *EMBO J* 6: 3571–3577

37) E Harlow, D Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

38) J Sorge, C West, B Westwood, E Beutler (1985) Molecular cloning and nucleotide sequence of human cerebroside cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7289–7293

39) TGM Schmidt, A Skerra (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Prot Engineering* 6: 109–122.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- 5 (i) ANMELDER:
 (A) NAME: von Schaewen, Antje, Dr. rer. nat.
 (B) STRASSE: Natruperstrasse 169a
10 (C) ORT: Osnabrück
 (E) LAND: Deutschland
 (F) POSTLEITZAHL: 49076
 (G) TELEFON: 0541-684029
- 15 (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Herstellung von
 Glykoproteinen in Pflanzen mit verminderter oder
20 fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI)-
 Aktivitaet unter Verwendung pflanzlicher gntI-
 Sequenzen
- 25 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6
- (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
 (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
30 (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)
- 35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

- 40 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 1669 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Doppelstrang
45 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA
- 50 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- 55 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Solanum tuberosum
 (B) STAMM: Desiree
60 (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: "sink" Organ
 (F) GEWEBETYP: Mesophyll
 (G) ZELLTYP: Blattzellen
- 65

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: Lambda ZAP II (EcoRI)
- (B) CLON(E): gntI-A1(K)

5

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE:659..667
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Asn-Codon ist eine
potentielle Glykosylierungsstelle"
/product= "Konsensus Sequenz fuer
N-Glykosylierung"
/phenotype= "N-Glykane modulieren
Proteineigenschaften"
/standard_name= "N-Glykosylierungsstelle"
/label= pot-CHO
/note= "fehlt in tierischen GntI-Sequenzen"

10

15

20

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:53..1393
- (C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 53
/function= "initiiert komplexe N-Glykane auf
sekret. Glykoproteinen"
/EC_number= 2.4.1.101
/product=
"beta-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase I"
/evidence= EXPERIMENTAL
/gene= "cgl"
/standard_name= "gntI"
/label= ORF
/note= "erste gntI-Sequenz aus Kartoffel
(unpubliziert)"

25

30

35

40

45

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE:15..52

50

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
- (B) LAGE:1394..1655

55

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:80..139
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Membrananker
(Aminosäuren 10-29)"
/product= "hydrophober Aminosäurebereich in
GntI"

60

65

/standard_name= "Membrananker eines Typ II
Golgi-Proteins"
/note= "durch Vergleich mit tierischen GnTI-
Sequenzen identifiziert"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE:1..14
(D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "zur Herstellung der
cDNA-Bank in Lambda ZAP II"
/product= "EcoRI/NotI-cDNA-Adaptor"
/number= 1

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE:1656..1669
(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "EcoRI/NotI-Adaptor"
/number= 2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAATTCGCGG CCGCCTGAGA AACCCCTCGAA TTCAATTTCG CATTTGGCAG AG ATG	55
Met	
1	
AGA GGG AAC AAG TTT TGC TTT GAT TTA CGG TAC CTT CTC GTC GTG GCT	103
Arg Gly Asn Lys Phe Cys Phe Asp Leu Arg Tyr Leu Leu Val Val Ala	
5 10 15	
GCT CTC GCC TTC ATC TAC ATA CAG ATG CGG CTT TTC GCG ACA CAG TCA	151
Ala Leu Ala Phe Ile Tyr Ile Gln Met Arg Leu Phe Ala Thr Gln Ser	
20 25 30	
GAA TAT GTA GAC CGC CTT GCT GCT GCA ATT GAA GCA GAA AAT CAT TGT	199
Glu Tyr Val Asp Arg Leu Ala Ala Ala Ile Glu Ala Glu Asn His Cys	
35 40 45	
ACA AGT CAG ACC AGA TTG CTT ATT GAC AAG ATT AGC CAG CAG CAA GGA	247
Thr Ser Gln Thr Arg Leu Leu Ile Asp Lys Ile Ser Gln Gln Gln Gly	
50 55 60 65	
AGA GTA GTA GCT CTT GAA GAA CAA ATG AAG CAT CAG GAC CAG GAG TGC	295
Arg Val Val Ala Leu Glu Glu Gln Met Lys His Gln Asp Gln Glu Cys	
70 75 80	
CGG CAA TTA AGG GCT CTT GTT CAG GAT CTT GAA AGT AAG GGC ATA AAA	343
Arg Gln Leu Arg Ala Leu Val Gln Asp Leu Glu Ser Lys Gly Ile Lys	
85 90 95	
AAG TTA ATC GGA GAT GTG CAG ATG CCA GTG GCA GCT GTA GTT GTT ATG	391
Lys Leu Ile Gly Asp Val Gln Met Pro Val Ala Val Val Val Met	
100 105 110	

DE 197 54 622 A 1

GCT TGC AGT CGT ACT GAC TAC CTG GAG AGG ACT ATT AAA TCC ATC TTA	439	
Ala Cys Ser Arg Thr Asp Tyr Leu Glu Arg Thr Ile Lys Ser Ile Leu		
115 120 125		5
AAA TAC CAA ACA TCT GTT GCA TCA AAA TAT CCT CTT TTC ATA TCC CAG	487	
Lys Tyr Gln Thr Ser Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe Ile Ser Gln		
130 135 140 145		10
GAT GGA TCA AAT CCT GAT GTA AGA AAG CTT GCT TTG AGC TAT GGT CAG	535	
Asp Gly Ser Asn Pro Asp Val Arg Lys Leu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln		
150 155 160		15
CTG ACG TAT ATG CAG CAC TTG GAT TAT GAA CCT GTG CAT ACT GAA AGA	583	
Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Tyr Glu Pro Val His Thr Glu Arg		
165 170 175		20
CCA GGG GAA CTG GTT GCA TAC TAC AAG ATT GCA CGT CAT TAC AAG TGG	631	
Pro Gly Glu Leu Val Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Lys Trp		
180 185 190		25
GCA TTG GAT CAG CTG TTT CAC AAG CAT AAT TTT AGC CGT GTT ATC ATA	679	
Ala Leu Asp Gln Leu Phe His Lys His Asn Phe Ser Arg Val Ile Ile		
195 200 205		30
CTA GAA GAT GAT ATG GAA ATT GCT GCT GAT TTT TTT GAC TAT TTT GAG	727	
Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Ala Asp Phe Phe Asp Tyr Phe Glu		
210 215 220 225		35
GCT GGA GCT ACT CTT CTT GAC AGA GAC AAG TCG ATT ATG GCT ATT TCT	775	
Ala Gly Ala Thr Leu Leu Asp Arg Asp Lys Ser Ile Met Ala Ile Ser		
230 235 240		40
TCT TGG AAT GAC AAT GGA CAA AGG CAG TTC GTC CAA GAT CCT GAT GCT	823	
Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Arg Gln Phe Val Gln Asp Pro Asp Ala		
245 250 255		45
CTT TAC CGC TCA GAC TTT TTT CCT GGT CTT GGA TGG ATG CTT TCA AAA	871	
Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met Leu Ser Lys		
260 265 270		50
TCA ACT TGG TCC GAA CTA TCT CCA AAG TGG CCA AAG GCT TAC TGG GAT	919	
Ser Thr Trp Ser Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala Tyr Trp Asp		
275 280 285		55
GAC TGG CTA AGG CTG AAA GAA AAT CAC AGA GGT CGA CAA TTT ATT CGC	967	
Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Arg Gly Arg Gln Phe Ile Arg		
290 295 300 305		60
CCA GAA GTT TGC AGA ACG TAC AAT TTT GGT GAG CAT GGT TCT AGT TTG	1015	
Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly Ser Ser Leu		
310 315 320		65
GGG CAG TTT TTT AAG CAG TAT CTT GAG CCA ATT AAG CTA AAT GAT GTC	1063	
Gly Gln Phe Phe Lys Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu Asn Asp Val		
325 330 335		
CAG GTT GAT TGG AAG TCA ATG GAC CTA AGT TAC CTT TTG GAG GAC AAC	1111	
Gln Val Asp Trp Lys Ser Met Asp Leu Ser Tyr Leu Leu Glu Asp Asn		
340 345 350		

DE 197 54 622 A 1

TAT GTG AAA CAC TTT GGC GAC TTG GTT AAA AAG GCT AAG CCC ATC CAC 1159
 Tyr Val Lys His Phe Gly Asp Leu Val Lys Lys Ala Lys Pro Ile His
 355 360 365
 5 GGA GCT GAT GCT GTT TTG AAA GCA TTT AAC ATA GAT GGT GAT GTG CGT 1207
 Gly Ala Asp Ala Val Leu Lys Ala Phe Asn Ile Asp Gly Asp Val Arg
 370 375 380 385
 10 ATT CAG TAC AGA GAC CAA CTA GAC TTT GAA GAT ATC GCT CGA CAG TTT 1255
 Ile Gln Tyr Arg Asp Gln Leu Asp Phe Glu Asp Ile Ala Arg Gln Phe
 390 395 400
 15 GGC ATT TTT GAA GAA TGG AAG GAT GGT GTA CCA CGG GCA GCA TAT AAA 1303
 Gly Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Ala Ala Tyr Lys
 405 410 415
 20 GGG ATA GTA GTT TTC CGG TTT CAA ACA TCT AGA CGT GTG TTC CTT GTT 1351
 Gly Ile Val Val Phe Arg Phe Gln Thr Ser Arg Arg Val Phe Leu Val
 420 425 430
 25 TCC CCT GAT TCT CTT CGA CAA CTT GGA GTT GAA GAT ACT TAG 1393
 Ser Pro Asp Ser Leu Arg Gln Leu Gly Val Glu Asp Thr *
 435 440 445
 CGAAGATATG ATTGGAGCCT GAGCAACAAT TTAGACTTAT TTGGTAGGAT ACATTTGAAA 1453
 30 GAGCTGACAC GAAAAGTATG ACTACCAGTA GCTACATGCA ACATTTTAAT GTTAATGGAA 1513
 GGAACCCACT GCTTATTGTT GGAATGGATG AATCATCACC ACATCCTATT ATTCAAGTTT 1573
 35 ACAAACATAA AGAGGAAATG TTGCCCTATA AAAACAAATT TTTTGTCTTCT AAGAAGGAAC 1633
 GTTACGATTA TGAGCAACTT TGGCGGCCGC GAATTC 1669

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 447 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

55 Met Arg Gly Asn Lys Phe Cys Phe Asp Leu Arg Tyr Leu Leu Val Val
 1 5 10 15
 Ala Ala Leu Ala Phe Ile Tyr Ile Gln Met Arg Leu Phe Ala Thr Gln
 20 25 30
 60 Ser Glu Tyr Val Asp Arg Leu Ala Ala Ala Ile Glu Ala Glu Asn His
 35 40 45
 65 Cys Thr Ser Gln Thr Arg Leu Leu Ile Asp Lys Ile Ser Gln Gln Gln
 50 55 60

DE 197 54 622 A 1

Gly Arg Val Val Ala Leu Glu Glu Gln Met Lys His Gln Asp Gln Glu	
65 70 75 80	
Cys Arg Gln Leu Arg Ala Leu Val Gln Asp Leu Glu Ser Lys Gly Ile	5
85 90 95	
Lys Lys Leu Ile Gly Asp Val Gln Met Pro Val Ala Ala Val Val Val	10
100 105 110	
Met Ala Cys Ser Arg Thr Asp Tyr Leu Glu Arg Thr Ile Lys Ser Ile	
115 120 125	
Leu Lys Tyr Gln Thr Ser Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe Ile Ser	15
130 135 140	
Gln Asp Gly Ser Asn Pro Asp Val Arg Lys Leu Ala Leu Ser Tyr Gly	20
145 150 155 160	
Gln Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Tyr Glu Pro Val His Thr Glu	
165 170 175	
Arg Pro Gly Glu Leu Val Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Lys	25
180 185 190	
Trp Ala Leu Asp Gln Leu Phe His Lys His Asn Phe Ser Arg Val Ile	30
195 200 205	
Ile Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Ala Asp Phe Phe Asp Tyr Phe	
210 215 220	
Glu Ala Gly Ala Thr Leu Leu Asp Arg Asp Lys Ser Ile Met Ala Ile	35
225 230 235 240	
Ser Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Arg Gln Phe Val Gln Asp Pro Asp	40
245 250 255	
Ala Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met Leu Ser	
260 265 270	
Lys Ser Thr Trp Ser Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala Tyr Trp	45
275 280 285	
Asp Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Arg Gly Arg Gln Phe Ile	50
290 295 300	
Arg Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly Ser Ser	
305 310 315 320	
Leu Gly Gln Phe Phe Lys Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu Asn Asp	55
325 330 335	
Val Gln Val Asp Trp Lys Ser Met Asp Leu Ser Tyr Leu Leu Glu Asp	60
340 345 350	
Asn Tyr Val Lys His Phe Gly Asp Leu Val Lys Lys Ala Lys Pro Ile	
355 360 365	
	65

His Gly Ala Asp Ala Val Leu Lys Ala Phe Asn Ile Asp Gly Asp Val
 370 375 380

5 Arg Ile Gln Tyr Arg Asp Gln Leu Asp Phe Glu Asp Ile Ala Arg Gln
 385 390 395 400

Phe Gly Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Ala Ala Tyr
 10 405 410 415

Lys Gly Ile Val Val Phe Arg Phe Gln Thr Ser Arg Arg Val Phe Leu
 420 425 430

15 Val Ser Pro Asp Ser Leu Arg Gln Leu Gly Val Glu Asp Thr *
 435 440 445

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1737 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

30 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

35

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Nicotiana tabacum
- (B) STAMM: Samsun NN
- (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: "sink" Organ
- (F) GEWEBETYP: Mesophyll
- (G) ZELLTYP: Blattzellen

40

45

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: Lambda ZAP II (EcoRI)
- (B) CLON(E): gntI-A9(T)

50

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 733..741
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "Asn-Codon ist eine
 potentielle Glykosylierungsstelle"
 /product= "Konsensus Sequenz für
 N-Glykosylierung"
 /phenotype= "N-Glykane modulieren
 Proteineigenschaften"
 /standard_name= "N-Glykosylierungsstelle"
 /label= pot-CHO
 /note= "fehlt in tierischen GntI-Sequenzen"

55

60

65

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:127..1467 5
- (C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 127
 - /function= "initiiert komplexe N-Glykane auf sekret. Glykoproteinen" 10
 - /EC_number= 2.4.1.101
 - /product= "beta-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase I" 15
 - /evidence= EXPERIMENTAL
 - /gene= "cgl"
 - /standard_name= "gntI"
 - /label= ORF 20
 - /note= "erste gntI-Sequenz aus Tabak (unpubliziert)"

(ix) MERKMAL: 25

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE:15..126

(ix) MERKMAL: 30

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
- (B) LAGE:1468..1723

(ix) MERKMAL: 35

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:154..213
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Membrananker (Aminosäuren 10-29)" 40
 - /product= "hydrophober Aminosäurebereich in GnTI"
 - /standard_name= "Membrananker eines Typ II Golgi-Proteins" 45
 - /note= "durch Vergleich mit tierischen GnTI-Sequenzen identifiziert" 50

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE:1..14 55
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "zur Herstellung der cDNA-Bank in Lambda ZAP II"
 - /product= "EcoRI/NotI-cDNA-Adaptor" 60
 - /number= 1

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature 65
- (B) LAGE:1724..1737

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "EcoRI/NotI-Adaptor"
/number= 2

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

10	GAATTCGCGG CCGCCATTGA CTTGATCCTA ACTGAACAGG CAAAGTAAAT CCAGCGATGA	60
	AACACTCATA ACTGAACACT GAGAGACTAT TCGCTTTCTC CTAAAGCCTT CAATCGAATT	120
15	CGCACG ATG AGA GGG AAC AAG TTT TGC TGT GAT TTC CGG TAC CTC CTC	168
	Met Arg Gly Asn Lys Phe Cys Cys Asp Phe Arg Tyr Leu Leu	
	450 455 460	
20	ATC TTG GCT GCT GTC GCC TTC ATC TAC ACA CAG ATG CGG CTT TTT GCG	216
	Ile Leu Ala Ala Val Ala Phe Ile Tyr Thr Gln Met Arg Leu Phe Ala	
	465 470 475	
25	ACA CAG TCA GAA TAT GCA GAT CGC CTT GCT GCT GCA ATT GAA GCA GAA	264
	Thr Gln Ser Glu Tyr Ala Asp Arg Leu Ala Ala Ala Ile Glu Ala Glu	
	480 485 490	
30	AAT CAT TGT ACA AGC CAG ACC AGA TTG CTT ATT GAC CAG ATT AGC CTG	312
	Asn His Cys Thr Ser Gln Thr Arg Leu Leu Ile Asp Gln Ile Ser Leu	
	495 500 505	
35	CAG CAA GGA AGA ATA GTT GCT CTT GAA GAA CAA ATG AAG CGT CAG GAC	360
	Gln Gln Gly Arg Ile Val Ala Leu Glu Glu Gln Met Lys Arg Gln Asp	
	510 515 520 525	
40	CAG GAG TGC CGA CAA TTA AGG GCT CTT GTT CAG GAT CTT GAA AGT AAG	408
	Gln Glu Cys Arg Gln Leu Arg Ala Leu Val Gln Asp Leu Glu Ser Lys	
	530 535 540	
45	GGC ATA AAA AAG TTG ATC GGA AAT GTA CAG ATG CCA GTG GCT GCT GTA	456
	Gly Ile Lys Lys Leu Ile Gly Asn Val Gln Met Pro Val Ala Ala Val	
	545 550 555	
50	GTT GTT ATG GCT TGC AAT CGG GCT GAT TAC CTG GAA AAG ACT ATT AAA	504
	Val Val Met Ala Cys Asn Arg Ala Asp Tyr Leu Glu Lys Thr Ile Lys	
	560 565 570	
55	TCC ATC TTA AAA TAC CAA ATA TCT GTT GCG TCA AAA TAT CCT CTT TTC	552
	Ser Ile Leu Lys Tyr Gln Ile Ser Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe	
	575 580 585	
60	ATA TCC CAG GAT GGA TCA CAT CCT GAT GTC AGG AAG CTT GCT TTG AGC	600
	Ile Ser Gln Asp Gly Ser His Pro Asp Val Arg Lys Leu Ala Leu Ser	
	590 595 600 605	
65	TAT GAT CAG CTG ACG TAT ATG CAG CAC TTG GAT TTT GAA CCT GTG CAT	648
	Tyr Asp Gln Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Phe Glu Pro Val His	
	610 615 620	
65	ACT GAA AGA CCA GGG GAG CTG ATT GCA TAC TAC AAA ATT GCA CGT CAT	696
	Thr Glu Arg Pro Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His	
	625 630 635	

DE 197 54 622 A 1

TAC AAG TGG GCA TTG GAT CAG CTG TTT TAC AAG CAT AAT TTT AGC CGT Tyr Lys Trp Ala Leu Asp Gln Leu Phe Tyr Lys His Asn Phe Ser Arg 640 645 650	744	
GTT ATC ATA CTA GAA GAT GAT ATG GAA ATT GCC CCT GAT TTT TTT GAC Val Ile Ile Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Pro Asp Phe Phe Asp 655 660 665	792	5
TTT TTT GAG GCT GGA GCT ACT CTT CTT GAC AGA GAC AAG TCG ATT ATG Phe Phe Glu Ala Gly Ala Thr Leu Leu Asp Arg Asp Lys Ser Ile Met 670 675 680 685	840	10
GCT ATT TCT TCT TGG AAT GAC AAT GGA CAA ATG CAG TTT GTC CAA GAT Ala Ile Ser Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Met Gln Phe Val Gln Asp 690 695 700	888	15
CCT TAT GCT CTT TAC CGC TCA GAT TTT TTT CCC GGT CTT GGA TGG ATG Pro Tyr Ala Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met 705 710 715	936	20
CTT TCA AAA TCT ACT TGG GAC GAA TTA TCT CCA AAG TGG CCA AAG GCT Leu Ser Lys Ser Thr Trp Asp Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala 720 725 730	984	25
TAC TGG GAC GAC TGG CTA AGA CTC AAA GAG AAT CAC AGA GGT CGA CAA Tyr Trp Asp Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Arg Gly Arg Gln 735 740 745	1032	30
TTT ATT CGC CCA GAA GTT TGC AGA ACA TAT AAT TTT GGT GAG CAT GGT Phe Ile Arg Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly 750 755 760 765	1080	35
TCT AGT TTG GGG CAG TTT TTC AAG CAG TAT CTT GAG CCA ATT AAA CTA Ser Ser Leu Gly Gln Phe Phe Lys Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu 770 775 780	1128	40
AAT GAT GTC CAG GTT GAT TGG AAG TCA ATG GAC CTT AGT TAC CTT TTG Asn Asp Val Gln Val Asp Trp Lys Ser Met Asp Leu Ser Tyr Leu Leu 785 790 795	1176	45
GAG GAC AAT TAC GTG AAA CAC TTT GGT GAC TTG GTT AAA AAG GCT AAG Glu Asp Asn Tyr Val Lys His Phe Gly Asp Leu Val Lys Lys Ala Lys 800 805 810	1224	50
CCC ATC CAT GGA GCT GAT GCT GTC TTG AAA GCA TTT AAC ATA GAT GGT Pro Ile His Gly Ala Asp Ala Val Leu Lys Ala Phe Asn Ile Asp Gly 815 820 825	1272	55
GAT GTG CGT ATT CAG TAC AGA GAT CAA CTA GAC TTT GAA AAT ATC GCA Asp Val Arg Ile Gln Tyr Arg Asp Gln Leu Asp Phe Glu Asn Ile Ala 830 835 840 845	1320	
CGG CAA TTT GGC ATT TTT GAA GAA TGG AAG GAT GGT GTA CCA CGT GCA Arg Gln Phe Gly Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Ala 850 855 860	1368	60
GCA TAT AAA GGA ATA GTA GTT TTC CGG TAC CAA ACG TCC AGA CGT GTA Ala Tyr Lys Gly Ile Val Val Phe Arg Tyr Gln Thr Ser Arg Arg Val 865 870 875	1416	65

DE 197 54 622 A 1

TTC CTT GTT GGC CAT GAT TCG CTT CAA CAA CTC GGA ATT GAA GAT ACT 1464
Phe Leu Val Gly His Asp Ser Leu Gln Gln Leu Gly Ile Glu Asp Thr
880 885 890

5 TAA CAAAGATATG ATTGCAGGAG CCCGGGCAAA ATTTTGTACT TATTGGGTAG 1517
*

10 GATGCATCGA GCTGACACTA AACCATGATT TTACCAGTTA CATACAACGT TTTAATGTAA 1577
TACGGAGGAG CTCACTGTTC TAGTGTTGAA GGGATATCGG CTTCTTAGTA TTGGATGAAT 1637
15 CATCAACACA ACCTATTATT TTAAGTGTTT AGAACATAAA GAGGAAATGT AGCCCTGTAA 1697
AGACTATACA TGGGACCATC ATAATCGCGG CCGCGAATTC 1737

20 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
25 (A) LÄNGE: 447 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

30 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

35 Met Arg Gly Asn Lys Phe Cys Cys Asp Phe Arg Tyr Leu Leu Ile Leu
1 5 10 15
Ala Ala Val Ala Phe Ile Tyr Thr Gln Met Arg Leu Phe Ala Thr Gln
20 25 30
40 Ser Glu Tyr Ala Asp Arg Leu Ala Ala Ile Glu Ala Glu Asn His
35 40 45
45 Cys Thr Ser Gln Thr Arg Leu Leu Ile Asp Gln Ile Ser Leu Gln Gln
50 55 60
Gly Arg Ile Val Ala Leu Glu Glu Gln Met Lys Arg Gln Asp Gln Glu
65 70 75 80
50 Cys Arg Gln Leu Arg Ala Leu Val Gln Asp Leu Glu Ser Lys Gly Ile
85 90 95
55 Lys Lys Leu Ile Gly Asn Val Gln Met Pro Val Ala Ala Val Val Val
100 105 110
Met Ala Cys Asn Arg Ala Asp Tyr Leu Glu Lys Thr Ile Lys Ser Ile
115 120 125
60 Leu Lys Tyr Gln Ile Ser Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe Ile Ser
130 135 140
65 Gln Asp Gly Ser His Pro Asp Val Arg Lys Leu Ala Leu Ser Tyr Asp
145 150 155 160

DE 197 54 622 A 1

Gln Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Phe Glu Pro Val His Thr Glu	
165 170 175	
Arg Pro Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Lys	5
180 185 190	
Trp Ala Leu Asp Gln Leu Phe Tyr Lys His Asn Phe Ser Arg Val Ile	10
195 200 205	
Ile Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Pro Asp Phe Phe Asp Phe Phe	
210 215 220	
Glu Ala Gly Ala Thr Leu Leu Asp Arg Asp Lys Ser Ile Met Ala Ile	15
225 230 235 240	
Ser Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Met Gln Phe Val Gln Asp Pro Tyr	20
245 250 255	
Ala Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met Leu Ser	
260 265 270	
Lys Ser Thr Trp Asp Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala Tyr Trp	25
275 280 285	
Asp Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Arg Gly Arg Gln Phe Ile	30
290 295 300	
Arg Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly Ser Ser	
305 310 315 320	
Leu Gly Gln Phe Phe Lys Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu Asn Asp	35
325 330 335	
Val Gln Val Asp Trp Lys Ser Met Asp Leu Ser Tyr Leu Leu Glu Asp	40
340 345 350	
Asn Tyr Val Lys His Phe Gly Asp Leu Val Lys Lys Ala Lys Pro Ile	
355 360 365	
His Gly Ala Asp Ala Val Leu Lys Ala Phe Asn Ile Asp Gly Asp Val	45
370 375 380	
Arg Ile Gln Tyr Arg Asp Gln Leu Asp Phe Glu Asn Ile Ala Arg Gln	50
385 390 395 400	
Phe Gly Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Ala Ala Tyr	
405 410 415	
Lys Gly Ile Val Val Phe Arg Tyr Gln Thr Ser Arg Arg Val Phe Leu	55
420 425 430	
Val Gly His Asp Ser Leu Gln Gln Leu Gly Ile Glu Asp Thr *	60
435 440 445	
	65

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- 5 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 510 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 10 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA
- 15 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- 20 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Arabidopsis thaliana
 (B) STAMM: Columbia
 25 (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: photosynthetisch aktive
 Organe
 (F) GEWEBETYP: Mesophyll
 (G) ZELLTYP: Blattzellen
 30
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
 (B) CLON(E): pGEM-T/4a-3* #12A
- 35 (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE:1..510
 40 (D) SONSTIGE ANGABEN:/EC_number= 2.4.1.101
 /product= "RT-PCR Produkt aus Blatt-mRNA"
 /gene= "cgl"
 /standard_name= "gntI"
 45 /note= "homolog zu anderen GntI-Sequenzen"
- (ix) MERKMAL:
 50 (A) NAME/SCHLÜSSEL: primer_bind
 (B) LAGE:1..48
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/standard_name= "PCR "sense"-
 Primer (gntI 4a) "
- 55 (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: primer_bind
 (B) LAGE:487..510
 60 (D) SONSTIGE ANGABEN:/standard_name= "PCR
 "antisense"-Primer (gntI 3*) "
- 65

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

ATC GGA AAG CTT GGA TCC CCA GTG GCG GCT GTA GTT GTT ATG GCT TGC Ile Gly Lys Leu Gly Ser Pro Val Ala Ala Val Val Val Met Ala Cys 450 455 460	48	5
AGT CGT GCA GAC TAT CTT GAA AGG ACT GTT AAA TCA GTT TTA ACA TAT Ser Arg Ala Asp Tyr Leu Glu Arg Thr Val Lys Ser Val Leu Thr Tyr 465 470 475	96	10
CAA ACT CCC GTT GCT TCA AAA TAT CCT CTA TTT ATA TCT CAG GAT GGA Gln Thr Pro Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe Ile Ser Gln Asp Gly 480 485 490 495	144	15
TCT GAT CAA GCT GTC AAG AGC AAG TCA TTG AGC TAT AAT CAA TTA ACA Ser Asp Gln Ala Val Lys Ser Lys Ser Leu Ser Tyr Asn Gln Leu Thr 500 505 510	192	20
TAT ATG CAG CAC TTG GAT TTT GAA CCA GTG GTC ACT GAA AGG CCT GGC Tyr Met Gln His Leu Asp Phe Glu Pro Val Val Thr Glu Arg Pro Gly 515 520 525	240	25
GAA CTG ACT GCG TAC TAC AAG ATT GCA CGT CAC TAC AAG TGG GCA CTG Glu Leu Thr Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Lys Trp Ala Leu 530 535 540	288	30
GAC CAG TTG TTT TAC AAA CAC AAA TTT AGT CGA GTG ATT ATA CTA GAA Asp Gln Leu Phe Tyr Lys His Lys Phe Ser Arg Val Ile Ile Leu Glu 545 550 555	336	35
GAT GAT ATG GAA ATT GCT CCA GAC TTC TTT GAT TAC TTT GAG GCT GCA Asp Asp Met Glu Ile Ala Pro Asp Phe Phe Asp Tyr Phe Glu Ala Ala 560 565 570 575	384	40
GCT AGT CTC ATG GAT AGG GAT AAA ACC ATT ATG GCT GCT TCA TCA TGG Ala Ser Leu Met Asp Arg Asp Lys Thr Ile Met Ala Ala Ser Ser Trp 580 585 590	432	45
ACT GAT AAT GGA CAG AAG CAG TTT GTG CAT GAT CCC TAT GCG CTA TAC Thr Asp Asn Gly Gln Lys Gln Phe Val His Asp Pro Tyr Ala Leu Tyr 595 600 605	480	50
CGA TCA GAT TTC TTC CCT GGC CAC GGC TGG Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly His Gly Trp 610 615	510	55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 170 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

5	Ile	Gly	Lys	Leu	Gly	Ser	Pro	Val	Ala	Ala	Val	Val	Val	Met	Ala	Cys
	1				5						10				15	
	Ser	Arg	Ala	Asp	Tyr	Leu	Glu	Arg	Thr	Val	Lys	Ser	Val	Leu	Thr	Tyr
				20					25					30		
10	Gln	Thr	Pro	Val	Ala	Ser	Lys	Tyr	Pro	Leu	Phe	Ile	Ser	Gln	Asp	Gly
			35					40					45			
15	Ser	Asp	Gln	Ala	Val	Lys	Ser	Lys	Ser	Leu	Ser	Tyr	Asn	Gln	Leu	Thr
		50					55					60				
	Tyr	Met	Gln	His	Leu	Asp	Phe	Glu	Pro	Val	Val	Thr	Glu	Arg	Pro	Gly
	65					70					75					80
20	Glu	Leu	Thr	Ala	Tyr	Tyr	Lys	Ile	Ala	Arg	His	Tyr	Lys	Trp	Ala	Leu
					85					90					95	
25	Asp	Gln	Leu	Phe	Tyr	Lys	His	Lys	Phe	Ser	Arg	Val	Ile	Ile	Leu	Glu
				100					105					110		
	Asp	Asp	Met	Glu	Ile	Ala	Pro	Asp	Phe	Phe	Asp	Tyr	Phe	Glu	Ala	Ala
			115					120					125			
30	Ala	Ser	Leu	Met	Asp	Arg	Asp	Lys	Thr	Ile	Met	Ala	Ala	Ser	Ser	Trp
			130				135					140				
35	Thr	Asp	Asn	Gly	Gln	Lys	Gln	Phe	Val	His	Asp	Pro	Tyr	Ala	Leu	Tyr
	145					150					155					160
	Arg	Ser	Asp	Phe	Phe	Pro	Gly	His	Gly	Trp						
40				165						170						

Patentansprüche

- 45 1. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine pflanzliche N-Acetylglucosaminyltransferase I kodiert.
2. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Solanum tuberosum* kodiert.
3. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Nicotiana tabacum* kodiert.
- 50 4. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Arabidopsis thaliana* kodiert.
5. DNA-Sequenz nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ. ID. NO: 5 angegebene Nukleotidsequenz umfaßt.
6. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ. ID. NO. 1 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon oder eine entsprechende komplementäre Nukleotidsequenz umfaßt.
- 55 7. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ. ID. NO. 3 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon oder eine entsprechende komplementäre Nukleotidsequenz umfaßt.
8. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ. ID. NO. 5 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon oder eine entsprechende komplementäre Nukleotidsequenz umfaßt.
- 60 9. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Substitution, Deletion und/oder Insertion einzelner oder mehrerer Nukleotide und/oder Verkürzung und/oder Verlängerung am 5'- und/oder 3'-Ende einer der DNA-Sequenzen nach einem der Ansprüche 1 bis 8 erhalten wird mit der Maßgabe, daß die DNA-Sequenz unter stringenten Bedingungen zumindest in einem Teilabschnitt mit der Ausgangs-DNA-Sequenz oder deren komplementärer Sequenz oder mit Teilen derselben hybridisiert.
- 65 10. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Gen darstellt oder Teil eines Gens ist, das das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I kodiert, und in ihrer Gesamtheit oder in einem Teilabschnitt
 - mit einer der DNA-Sequenzen oder -Fragmente nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und/oder
 - mit einer DNA-Sequenz, die von den in den SEQ ID NO: 1, 3 und/oder 5 angegebenen Aminosäuresequenzen

zen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes abgeleitet worden ist, unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

11. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie in ihrer Gesamtheit oder in einem Teilbereich mit einer oder mehreren der DNA-Sequenzen nach einem der Ansprüche 1 bis 10 hybridisiert.
12. DNA-Konstrukt, dadurch gekennzeichnet, daß es eine oder mehrere der DNA-Sequenzen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 umfaßt.
13. "antisense"-Konstrukt, dadurch gekennzeichnet, daß es eine "antisense"-DNA bezüglich der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und ggf. regulatorische Sequenzen für die Transkription der "antisense"-DNA umfaßt.
14. "sense"-Konstrukt, dadurch gekennzeichnet, daß es eine "sense"-DNA bezüglich der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und ggf. regulatorische Sequenzen für die Transkription der "sense"-DNA umfaßt.
15. Vektor, Plasmid, Cosmid, Viren- oder Phagengenom, dadurch gekennzeichnet, daß er oder es zumindest eine DNA-Sequenz und/oder ein Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 14 umfaßt.
16. Pflanzliche N-Acetylglucosaminyltransferase I
17. N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Solanum tuberosum*.
18. N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Nicotiana tabacum*.
19. N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Arabidopsis thaliana*.
20. N-Acetylglucosaminyltransferase I nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die in SEQ ID NO: 6 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.
21. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die in SEQ ID NO: 2 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.
22. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die Aminosäuren 74 bis 446 der SEQ ID NO: 2 angegebenen Aminosäuresequenz umfaßt.
23. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die in SEQ ID NO: 4 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.
24. N-Acetylglucosaminyltransferase I, zugänglich aufgrund der Hybridisierung ihres Gen oder eines oder mehrerer Abschnitte ihres Gens mit einer oder mehreren der DNA-Sequenzen und/oder DNA-Fragmente gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11.
25. Von den Enzymen gemäß einem der Ansprüche 16 bis 24 durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Modifikation einzelner Aminosäuren und/oder kleinerer Gruppen von Aminosäuren und/oder durch N- und/oder C-terminale Verkürzung und/oder Verlängerung abgeleitete Enzyme oder Proteine.
26. Protein oder Peptid, umfassend einen oder mehrere Abschnitte der Aminosäuresequenz(en) eines oder mehrerer der in einem der Ansprüche 16 bis 25 definierten Enzyme.
27. Protein oder Peptid, welches durch eine der DNA-Sequenzen nach einem der Ansprüche 1 bis 11 kodiert wird.
28. Antigen, dadurch gekennzeichnet, daß es
 - die in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 angegebene Aminosäuresequenz oder
 - die Aminosäuren 74 bis 446 der in Fig. 2 angegebenen Aminosäuresequenz oder
 - eine durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Modifikation einzelner Aminosäuren und/oder kleinerer Gruppen von Aminosäuren von den in SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 angegebenen Aminosäuresequenzen abgeleitete Aminosäuresequenz oder
 - einen Teil oder mehrere Teile dieser Sequenzen
 umfaßt mit der Maßgabe, daß das Antigen bei Immunisierung eines Wirtes mit diesem zur Bildung einer immunologischen Reaktion einschließlich der Erzeugung von gegen das Antigen gerichteten Antikörpern führt.
29. Monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er spezifisch eines oder mehrere der Enzyme oder Antigene nach einem der Ansprüche 16 bis 28 erkennt und dieses oder diese bindet.
30. Monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er durch Immunisierung eines Wirtes mit einem oder mehreren Antigenen nach Anspruch 28 erhalten werden kann.
31. Mikroorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß er durch mindestens eine der Nukleotidsequenzen, ausgewählt aus den DNA-Sequenzen, Konstrukten, Vektoren, Plasmiden, Cosmiden, Viren- oder Phagengenomen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 15, transformiert ist.
32. Verwendung eines oder mehrerer Antikörper nach Anspruch 29 und/oder Anspruch 30 zur Detektion von Pflanzen mit fehlendem oder defektem N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzym.
33. Verwendung einer oder mehrerer der DNA-Sequenzen und/oder Konstrukte nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Detektion von Pflanzen mit fehlendem oder defektem Gen für das N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzym.
34. Verwendung eines oder mehrerer "antisense"-Konstrukte nach Anspruch 13 zur Erzeugung von Pflanzen mit fehlender oder verminderter N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität.
35. Verwendung eines oder mehrerer "sense"-Konstrukte nach Anspruch 14 zur Erzeugung von Pflanzen mit fehlender oder verminderter N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität.
36. Transgene Pflanze, transgener Samen, transgenes Vermehrungsmaterial, Teile transgener Pflanzen oder transformierte Pflanzenzelle, erhältlich durch Integration einer oder mehrerer DNA-Sequenz(en) oder Konstrukt(e) nach einem der Ansprüche 1 bis 12 unter Kontrolle eines in Pflanzen wirksamen Promotors in das Genom einer Pflanze oder durch Infektion durch ein eine oder mehrere DNA-Sequenz(en) oder Konstrukt(e) nach einem der Ansprüche 1 bis 12 enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Expression der DNA-Sequenz(en) oder des Konstrukts/der Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe.
37. Transgene Pflanze, transgener Samen, transgenes Vermehrungsmaterial, Teile transgener Pflanzen oder transformierte Pflanzenzelle mit fehlender oder verminderter N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität, erhältlich durch Integration eines oder mehrerer "antisense"-Konstrukt(e) nach Anspruch 13 unter Kontrolle eines in Pflanzen wirksamen Promotors in das Genom einer Pflanze oder durch virale Infektion durch ein eines oder mehrere "anti-

sense"-Konstrukt(e) nach Anspruch 13 enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Transkription des "antisense"-Konstrukts oder der "antisense"-Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe.

38. Transgene Pflanze, transgener Samen, transgenes Vermehrungsmaterial, Teile transgener Pflanzen oder transformierte Pflanzenzelle mit fehlender oder verminderter N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität, erhältlich durch Integration eines oder mehrerer "sense"-Konstrukt(e) nach Anspruch 14 unter Kontrolle eines in Pflanzen wirksamen Promotors in das Genom einer Pflanze oder durch virale Infektion durch ein eines oder mehrere "sense"-Konstrukt(e) nach Anspruch 14 enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Transkription des "sense"-Konstrukts oder der "sense"-Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe.

39. Verfahren zur Erzeugung von Glykoproteinen mit minimalen, einheitlichen und definierten Zuckerresten, umfassend das Züchten einer transgenen Pflanze, von Teilen transgener Pflanzen oder von transformierten Pflanzenzellen nach Anspruch 37 oder 38 und das Isolieren des gesuchten Glykoproteins aus dem gezüchteten Material.

40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß die eingesetzte transgene Pflanze zusätzlich mit dem das gesuchte Glykoprotein kodierenden Gen transformiert worden ist.

41. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation der eingesetzten transgenen Pflanze durch Integration des das gesuchte Glykoprotein kodierenden Gens unter Kontrolle eines in Pflanzen wirksamen Promotors in das Genom der transgenen Pflanze oder durch eine Infektion der transgenen Pflanze durch ein Virus, das ein Gen enthält, das das gesuchte Glykoprotein kodiert, für eine extrachromosomale Propagation und Expression des Gens in infiziertem Pflanzengewebe erfolgt.

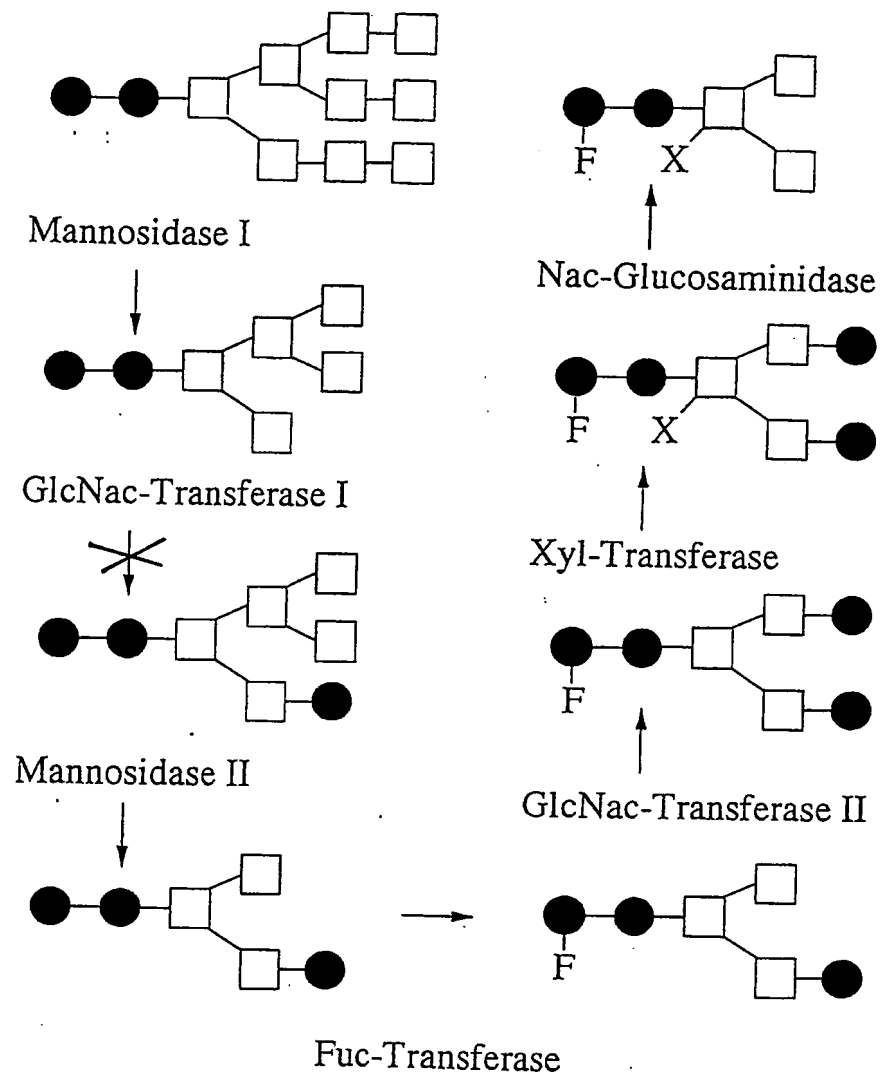
42. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, daß die zusätzlich mit dem das gesuchte Glykoprotein kodierenden Gen transformierte transgene Pflanze durch gleichzeitige Transformation einer Ausgangspflanze sowohl mit dem "antisense"- oder "sense"-Konstrukt als auch dem das gesuchte Glykoprotein kodierenden Gen erzeugt wurde.

43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation durch virale Infektion durch ein Virus, das sowohl das "antisense"- oder "sense"-Konstrukt als auch das das gesuchte Glykoprotein kodierende Gen enthält, für eine extrachromosomale Propagation und Transkription oder Expression in infiziertem Pflanzengewebe erfolgt.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Figur 1



Figur 2

A1 *GntI* cDNA

GAATTCGCGG CCGCCTGAGA AACCCCTCGAA TTCAATTTCG CATTTGGCAG AG ATG	55
	Met
	1
AGA GGG AAC AAG TTT TGC TTT GAT TTA CGG TAC CTT CTC GTC GTG GCT	103
Arg Gly Asn Lys Phe Cys Phe Asp Leu Arg Tyr Leu Leu Val Val Ala	
	5 10 15
GCT CTC GCC TTC ATC TAC ATA CAG ATG CGG CTT TTC GCG ACA CAG TCA	151
Ala Leu Ala Phe Ile Tyr Ile Gln Met Arg Leu Phe Ala Thr Gln Ser	
	20 25 30
GAA TAT GTA GAC CGC CTT GCT GCT GCA ATT GAA GCA GAA AAT CAT TGT	199
Glu Tyr Val Asp Arg Leu Ala Ala Ile Glu Ala Glu Asn His Cys	
	35 40 45
ACA AGT CAG ACC AGA TTG CTT ATT GAC AAG ATT AGC CAG CAG CAA GGA	247
Thr Ser Gln Thr Arg Leu Leu Ile Asp Lys Ile Ser Gln Gln Gln Gly	
	50 55 60 65
AGA GTA GTA GCT CTT GAA GAA CAA ATG AAG CAT CAG GAC CAG GAG TGC	295
Arg Val Val Ala Leu Glu Glu Gln Met Lys His Gln Asp Gln Glu Cys	
	70 75 80
CGG CAA TTA AGG GCT CTT GTT CAG GAT CTT GAA AGT AAG GGC ATA AAA	343
Arg Gln Leu Arg Ala Leu Val Gln Asp Leu Glu Ser Lys Gly Ile Lys	
	85 90 95
AAG TTA ATC GGA GAT GTG CAG ATG CCA GTG GCA GCT GTA GTT GTT ATG	391
Lys Leu Ile Gly Asp Val Gln Met Pro Val Ala Ala Val Val Val Met	
	100 105 110
GCT TGC AGT CGT ACT GAC TAC CTG GAG AGG ACT ATT AAA TCC ATC TTA	439
Ala Cys Ser Arg Thr Asp Tyr Leu Glu Arg Thr Ile Lys Ser Ile Leu	
	115 120 125
AAA TAC CAA ACA TCT GTT GCA TCA AAA TAT CCT CTT TTC ATA TCC CAG	487
Lys Tyr Gln Thr Ser Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe Ile Ser Gln	
	130 135 140 145
GAT GGA TCA AAT CCT GAT GTA AGA AAG CTT GCT TTG AGC TAT GGT CAG	535
Asp Gly Ser Asn Pro Asp Val Arg Lys Leu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln	
	150 155 160
CTG ACG TAT ATG CAG CAC TTG GAT TAT GAA CCT GTG CAT ACT GAA AGA	583
Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Tyr Glu Pro Val His Thr Glu Arg	
	165 170 175
CCA GGG GAA CTG GTT GCA TAC TAC AAG ATT GCA CGT CAT TAC AAG TGG	631
Pro Gly Glu Leu Val Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Lys Trp	
	180 185 190
GCA TTG GAT CAG CTG TTT CAC AAG CAT AAT TTT AGC CGT GTT ATC ATA	679
Ala Leu Asp Gln Leu Phe His Lys His Asn Phe Ser Arg Val Ile Ile	
	195 200 * 205
CTA GAA GAT GAT ATG GAA ATT GCT GCT GAT TTT TTT GAC TAT TTT GAG	727
Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Ala Asp Phe Phe Asp Tyr Phe Glu	
	210 215 220 225